



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**PAPEL DE LAS VIROPORINAS E, 3a y 8a  
DEL CORONAVIRUS DEL SARS EN  
REPLICACIÓN Y VIRULENCIA**

**CARLOS CASTAÑO RODRÍGUEZ**

Madrid, Septiembre de 2018



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**PAPEL DE LAS VIROPORINAS E, 3a y 8a  
DEL CORONAVIRUS DEL SARS EN  
REPLICACIÓN Y VIRULENCIA**

**Memoria presentada por el Licenciado en Bioquímica Carlos Castaño Rodríguez, adscrito al Departamento de Biología Molecular, para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.**

**El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la codirección de los Drs Luis Enjuanes Sánchez e Isabel Sola Gurpegui.**



El trabajo que se describe en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la codirección de los Drs. Luis Enjuanes Sánchez e Isabel Sola Gurpegui.

Madrid, Septiembre de 2018

Fdo. Luis Enjuanes Sánchez

Fdo. Isabel Sola Gurpegui

## **AGRADECIMIENTOS**



## ÍNDICE

<b>ÍNDICE.....</b>	<b>II</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMEN EN CASTELLANO .....</b>	<b>XIII</b>
<b>RESUMEN EN INGLÉS.....</b>	<b>XVII</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CORONAVIRUS .....</b>	<b>3</b>
1.2 Clasificación taxonómica.....	3
1.2. Epidemiología .....	4
1.3. Estructura del virión .....	6
1.4. Estructura del genoma y expresión génica.....	6
1.5. Ciclo infectivo.....	8
<b>2. EL SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO Y GRAVE.....</b>	<b>10</b>
2.1. Bases moleculares de la patología.....	10
2.2. Inmunopatología de la enfermedad .....	11
2.3. Modelos animales .....	13
2.4. Terapias .....	13
<b>3. PROTEÍNAS VIRALES CON ACTIVIDAD CANAL IÓNICO.....</b>	<b>14</b>
3.1. Descripción y funciones.....	14
3.2. Proteínas de los coronavirus con actividad canal iónico.....	15
3.3. Proteínas del SARS-CoV con actividad canal iónico.....	17
<b>4. LOS DOMINIOS PDZ.....</b>	<b>18</b>
4.1. Estructura y distribución .....	18
4.2. Proteínas virales con motivos de unión a PDZ .....	20
4.3. Proteínas de coronavirus con motivos de unión a PDZ.....	22
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>1. CÉLULAS EUCARIOTAS .....</b>	<b>31</b>
1.1. Líneas celulares.....	31
1.2. Cultivo de células eucariotas.....	31
<b>2. BACTERIAS .....</b>	<b>31</b>
2.1. Cepas y cultivos de bacterias .....	31
2.2. Generación de bacterias competentes .....	32
2.3. Transformación de bacterias .....	32
<b>3. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA.....</b>	<b>32</b>
3.1. Plásmidos .....	32
3.2. Purificación de plásmidos y fragmentos de DNA .....	33
3.3. Enzimas de restricción y ligación del DNA .....	33
3.4. Amplificación del DNA mediante PCR.....	33
3.5. Electroforesis del DNA en geles de agarosa .....	34
<b>4. OBTENCIÓN DE SARS-CoVs RECOMBINANTES.....</b>	<b>34</b>
4.1. Manipulación del SARS-CoV en cultivos celulares.....	34
4.2. Construcción de cDNAs infectivos.....	35
4.3. Transfección y rescate de SARS-CoVs recombinantes.....	38
<b>5. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA.....</b>	<b>38</b>
5.1. Extracción del RNA total intracelular.....	38
5.2. Generación de cDNAs mediante RT-PCR.....	38
<b>6. PURIFICACIÓN, MANIPULACIÓN Y EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS.....</b>	<b>39</b>

6.1. Obtención y purificación de proteína 3a del SARS-CoV y sus mutantes a partir de un baculovirus recombinante (rBV-3a) .....	39
6.2. Generación de anticuerpos específicos para la proteína 3a del SARS-CoV.....	39
6.3. Inmunodetección de proteínas ( <i>Western blot</i> ).....	40
6.4. Inmunofluorescencia indirecta.....	40
<b>7. MEDIDAS DE LA ACTIVIDAD CANAL IÓNICO .....</b>	<b>41</b>
7.1. Reconstitución de canales iónicos en membranas lipídicas artificiales.....	41
<b>8. PATOGENESIS VIRAL EN RATÓN .....</b>	<b>42</b>
8.1. Cepa de ratón utilizada, inoculación y manejo de ratones infectados.....	42
8.2. Seguimiento de la enfermedad y análisis de la virulencia.....	42
8.3. Producción viral en los pulmones de ratón.....	42
8.4. Extracción de RNA de pulmón.....	42
<b>9. ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO DE LEVADURA .....</b>	<b>43</b>
9.1. Doble híbrido de levadura para estudiar la interacción del dominio carboxilo terminal de la proteína 3a de SARS-CoV.....	43
9.2. Doble híbrido de levadura para estudiar la interacción de los PBMs de SARS-CoV y MERS-CoV con el PDZoma humano.....	44
<b>10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>44</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>1. RELEVANCIA DE LAS VIROPORINAS DEL SARS-CoV EN SU REPLICACIÓN Y PATOGENICIDAD.....</b>	<b>47</b>
1.1 Rescate, caracterización y crecimiento de mutantes de delección del SARS-CoVs para cada una de sus viroporinas.....	47
1.2 Relevancia de las viroporinas del SARS-CoV en patogénesis en el modelo de ratón Balb/c.....	48
<b>2. ACTIVIDAD CANAL IÓNICO DE LA PROTEÍNA 3a DEL SARS-CoV .....</b>	<b>51</b>
2.1 Conductancia, regulación por voltaje y selectividad de la proteína E del SARS-CoV en membranas lipídicas artificiales.....	51
2.2 Identificación de aminoácidos esenciales para la actividad CI de la proteína 3a.....	53
<b>3. RELEVANCIA DE LA ACTIVIDAD CI DE LA PROTEÍNA 3a DEL SARS-CoV EN LA REPLICACIÓN Y PATOGENICIDAD VIRAL.....</b>	<b>55</b>
3.1 Rescate, caracterización y crecimiento de mutantes defectivos en la actividad IC de la proteína 3a .....	55
3.2 Influencia de la actividad CI de la proteína 3a del SARS-CoV en la patogénesis que causa en ratones BALB/c.....	56
<b>4. RELEVANCIA DEL MOTIVO DE UNIÓN A DOMINIOS PDZ DE LA PROTEÍNA 3a DEL SARS-CoV EN LA PRODUCCIÓN Y LA EVOLUCIÓN VIRAL .....</b>	<b>59</b>
4.1 Rescate, caracterización y crecimiento de mutantes del SARS-CoV sin motivos de unión a dominios PDZ en la proteína 3a.....	59
4.2 Influencia del PBM de la proteína 3a del SARS-CoV en su patogenicidad en ratones BALB/c .....	59
<b>5. REQUERIMIENTO SIMULTÁNEO DE LAS VIROPORINAS DEL SARS-CoV .....</b>	<b>60</b>
5.1 Localización subcelular de la proteína 3a del SARS-CoV.....	61
5.2 Identificación de motivos potencialmente responsables de la complementación entre las proteínas E y 3a .....	64
<b>6. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES QUE INTERACCIONAN CON LA PROTEÍNA 3a.....</b>	<b>68</b>
<b>7. IDENTIFICACIÓN DE MOTIVOS PBM EN OTRAS PROTEÍNAS DE CoVs.....</b>	<b>72</b>
<b>8. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES CON DOMINIOS PDZ QUE INTERACCIONAN CON LOS PBM DE PROTEÍNAS DE SARS-CoV Y MERS-CoV EN UN ENSAYO DE Y2H RESTRINGIDO AL PDZOMA HUMANO .....</b>	<b>73</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>81</b>

<b>1. RELEVANCIA DE LAS VIROPORINAS DEL SARS-CoV EN REPLICACIÓN Y VIRULENCIA.....</b>	<b>85</b>
<b>2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CANAL IÓNICO DE LA PROTEÍNA 3a Y LOCALIZACIÓN DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES PARA ESTA ACTIVIDAD .....</b>	<b>87</b>
<b>3. ANÁLISIS DE LA RELEVANCIA DE LA ACTIVIDAD CANAL IÓNICO Y PBM DE LA PROTEÍNA 3a EN REPLICACIÓN Y VIRULENCIA DEL SARS-CoV .....</b>	<b>88</b>
<b>4. INTERDEPENDENCIA DE LAS TRES VIROPORINAS DEL SARS-CoV PARA LA VIABILIDAD VIRAL .....</b>	<b>89</b>
<b>5. PROTEÍNAS CELULARES QUE INTERACCIONAN CON LA PROTEÍNA 3a.....</b>	<b>92</b>
<b>6. IDENTIFICACIÓN DE MOTIVOS PBM EN OTRAS PROTEÍNAS DE CoVs.....</b>	<b>94</b>
<b>7. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CON DOMINIOS PDZ QUE INTERACCIONAN CON LOS PBM DE PROTEÍNAS DE SARS-CoV Y MERS-CoV EN UN ENSAYO DE Y2H RESTRINGIDO AL PDZOMA HUMANO .....</b>	<b>94</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>99</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>127</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Taxonomía del orden <i>Nidovirales</i> .....	3
2. Estructura del virión del SARS-CoV .....	6
3. Expresión génica en el SARS-CoV .....	7
4. Ciclo infectivo de los coronavirus .....	9
5. Bases de la patología pulmonar causada por el SARS-CoV .....	12
6. Estructura de los dominios PDZ .....	20
7. Cinéticas de crecimiento de mutantes de delección de las vioporinas del SARS-CoV .....	48
8. Patogénesis inducida por mutantes de delección de las vioporinas del SARS-CoV .....	49
9. Histopatología inducida por los mutantes de delección de las vioporinas del SARS-CoV .....	50
10. Caracterización de la actividad canal iónico de la proteína 3a del SARS-CoV ....	52
11. Efecto de las mutaciones en el canal iónico de la proteína 3a del SARS-CoV .....	54
12. Cinéticas de crecimiento de mutantes enfocados en la actividad canal iónico de la proteína 3a .....	56
13. Patogénesis inducida por mutantes que afectan a la actividad canal iónico de la proteína 3a .....	58
14. Cinéticas de crecimiento del mutante desprovisto del PBM de la proteína 3a del SARS-CoV .....	60
15. Patogénesis inducida por el mutante sin el PBM de la proteína 3a del SARS-CoV .....	61
16. Análisis de la localización de la proteína 3a con de la proteína E y en reservorios subcelulares de calcio mediante inmunofluorescencia .....	63
17. Localización subcelular de la proteína 3a mediante inmunofluorescencia .....	65
18. Localización del dominio de la proteína E que ejerce la complementación con la proteína 3a .....	66
19. Relevancia del PBM de la proteína 3a en la complementación con la proteína E .....	67
20. Relevancia de la longitud del dominio carboxilo terminal de la proteína E para la complementación con la proteína 3a .....	68

<b>21.</b> Virulencia causada por los mutantes del SARS-CoV que combinan la eliminación de los PBM de las proteínas 3a y E .....	69
<b>22.</b> Esquema del experimento de Y2H para estudiar la interacción de la proteína 3a del SARS-CoV con proteínas celulares .....	70
<b>23.</b> Esquema del experimento de Y2H para estudiar la interacción de los PBMs de SARS-CoV y MERS-CoV con los dominios PDZ humanos .....	75
<b>24.</b> Ensayo de doble híbrido de levadura restringido al PDZoma humano .....	76
<b>25.</b> Alineamiento de los DTMs de viroporinas de CoV .....	87
<b>26.</b> Conservación evolutiva de los PBMs de las proteínas E y 3a de SARS-CoV y E y 5 de MERS-CoV .....	91

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>I.</b> Proteínas virales con actividad canal iónico .....	16
<b>II.</b> Proteínas virales con PBMs y los dominios PDZ con los que interaccionan .....	21
<b>III.</b> Secuencia de los oligos utilizados .....	37
<b>IV.</b> Potencial de reversión (Erev) de la proteína 3a en experimentos en soluciones de 500/50mM .....	53
<b>V.</b> Mutaciones en el canal iónico de la proteína 3a del SARS-CoV .....	54
<b>VI.</b> Requerimiento simultáneo de las viroporinas del SARS-CoV .....	62
<b>VII.</b> Análisis de la colocalización mediante el Coeficiente de Pearson .....	64
<b>VIII.</b> Proteínas celulares que interaccionan con la proteína 3a del SARS-CoV .....	71
<b>IX.</b> Relación potencial entre las proteínas celulares que interaccionan con la proteína 3a con mayor confianza y la influencia sobre la patogenicidad viral .....	72
<b>X.</b> Distribución de PBMs en coronavirus .....	73-74
<b>XI.</b> Proteínas celulares con dominios PDZ que interaccionan con los PBMs de las proteínas E y 3a de SARS-CoV y con las proteínas E y 5 de MERS-CoV .....	77
<b>XII.</b> Funciones descritas para las proteínas con dominios PDZ que interaccionan con los PBMs de CoV .....	78-79

## **ABREVIATURAS**



ACE2	Enzima convertidora de angiotensina 2
Acp	Anticuerpo policlonal
ACTV-1	Chlorovirus del alga <i>Acanthocystis turfacea</i>
ALCoV	Coronavirus del leopardo asiático
ALI	Daño pulmonar agudo
APBA	Proteína de unión al precursor proteico amiloide
ARDS	Síndrome de distrés respiratorio agudo
ATI	Células alveolares tipo I
ATII	Células alveolares tipo II
BAC	Cromosoma artificial de bacterias
BCoV	Coronavirus bovino
BEFV	Virus bovino de la fiebre efímera
BSA	Albúmina sérica bovina
CAP	7-metil-guanosina
CB	Células bronquiales
CCL	Ligando de quimioquina con motivo CC
CCoV	Coronavirus canino
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CI	Canal iónico
CoV	Coronavirus
CRAC	Canal iónico activado por la liberación de calcio
CSFV	Virus de la peste porcina clásica
CSTB	Cistatina B
Cx43	Conexina 43
CXCL10	Quimioquina con motivo C-X-C 10
DAPI	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DENV	Virus del dengue
DLG	Proteína supresora de tumores
DlgA	Proteína supresora de tumores de <i>Drosophila</i>
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPC	Dioleoil fosfatidilcolina
DOPE	Dioleoil fosfatidiletanolamina
DOPS	Dioleoil fosfatidilserina
DTM	Dominio transmembrana
EAV	Virus de la arteritis equina
ECMV	Virus de la encefalomiocarditis
EDTA	Ácido etiléndiaminotetraacético
Erb2	Proteína de Erbin 2
E <sub>rev</sub>	Potencial de reversión
ERGIC	Compartimento intermedio entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi
FBS	Suero fetal bovino
FIPV	Virus de la peritonitis infecciosa felina
FMDV	Virus de la fiebre aftosa
FN	Fibronectina
GORASP	Proteína de reensamblaje del aparato de Golgi
GRIP	Proteína que interacciona con el receptor de glutamato
HBV	Virus de la hepatitis B
HCoV	Coronavirus humano
HCV	Virus de la hepatitis C
Hdi	Horas después de la infección
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HEV	Virus de la hepatitis E
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HKU	Coronavirus de la universidad de Hong-Kong
HMPV	Metapneumovirus humano
HPV16	Papilomavirus humano 16
HRP	Peroxidasa del rábano picante
HTLV-1	Virus linfotrópico de células T humanas

IBV	Virus de la bronquitis infecciosa aviar
IFN	Interferón
IKCa1	Canal de potasio de conductancia intermedia activado por calcio
IL	Interleuquina
IMAC	Cromatografía de afinidad metálica
INADL	Componente del complejo de polaridad celular crumbs
IRF	Factor regulador del interferón
JCV	Virus John Cunningham
SV40	Virus vacuolante del simio 40
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
KLF	Factor tipo Kruppel
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LNx	Ligando X de la proteína numb
LT	Leucotrienos
MA15	Virus SARS-CoV adaptado a ratón
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
mdi	Multiplicidad de infección
MERS	Síndrome respiratorio del Oriente Medio
MHV	Virus de la hepatitis del ratón
MØ	Macrófagos
MPDZ	Proteína con múltiples dominios PDZ
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MYCBP2	Proteína de unión a Myc 2
NCOA6	Coactivador del receptor nuclear 6
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NHERF1	Factor regulador que intercambia Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
NØ	Neutrófilos
nsp	Proteína no estructural
ORF	Fase de lectura abierta
OX	Compuestos oxidantes
PALS1	Proteína de membrana palmitoilada 5
PBM	Motivo de unión a dominios PDZ
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PDZD2	Proteína que contiene dominio PDZ 2
PEDV	Virus de la diarrea epidémica porcina
PICK1	Proteína que interacciona con la proteína quinasa C 1
PIK3C2G	Unidad catalítica tipo 2 gamma de la fosfatidil inositol-4-fosfato 3-quinasa
PKC	Proteína quinasa C
poliA	Tramo de poliadeninas
PRCoV	Coronavirus porcino
PRRSV	Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino
PSD95	Proteína de densidad post-sináptica
PSMD9	Subunidad 26S no ATPasa 9 del proteasoma
PT	Proteasas
PTPN	Proteína tirosín-fosfatasa
RABV	Virus de la rabia
rBV	Baculovirus recombinante
RE	Retículo endoplasmático
RhPV	Papilomavirus de macaco
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
RS	Sentido reverso
RSV	Virus respiratorio sincitial
RT	Transcripción reversa
RTC	Complejo de replicación-transcripción
RV	Rotavirus

SARS	Síndrome respiratorio agudo y grave
SCRIB	Proteína Scribble
SDS	Dodecilsulfato sódico
sgmRNA	Ácido ribonucleico mensajero subgenómico de polaridad positiva
sgRNA	Ácido ribonucleico subgenómico de polaridad negativa
SNTG2	Sintropina gamma 2
ssRV	Reovirus del <i>Scylla serrata</i>
SW	Coronavirus de ballena
TBEV	Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas
TCoV	Coronavirus de pavo
TCR	Receptor de linfocitos T
TGEV	Virus de la gastroenteritis porcina transmisible
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TJP3	Proteína de las uniones oclusivas
Tm	Temperatura de fusión
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRS	Secuencia reguladora de la transcripción
T $\beta$ R	Receptor del factor de crecimiento transformante beta
ufp	Unidades formadoras de placas
UI	Unidad de actividad enzimática
USH1C	Harmonina
UTR	Región no traducida
VDM	Vesícula de doble membrana
VS	Sentido viral
WNV	Virus del Nilo Occidental
WT	Tipo parental
Y2H	Doble híbrido de levadura
ZNF518A	Proteína de dedos de zinc 518 <sup>a</sup>
ZO-1	Zonula occludens 1

## **RESUMEN EN CASTELLANO**

En 2003, el coronavirus (CoV) del síndrome respiratorio agudo y grave (SARS-CoV) afectó a más de 8000 personas de 26 países, causando un 10% de mortalidad. Las vioporinas son proteínas virales con actividad canal iónico (CI). El SARS-CoV incluye tres vioporinas: 3a, E y 8a. De estas, las proteínas E y 3a poseen además un motivo de unión a dominios PDZ (PBM). Los dominios PDZ se encuentran en más de 400 proteínas celulares por lo que los virus con PBMs tienen un alto potencial para modificar el comportamiento celular. En esta tesis, se ha estudiado la relevancia de estas vioporinas y, más específicamente, de sus CIs y PBMs, en la replicación y virulencia del SARS-CoV mediante la combinación de estrategias multidisciplinarias. Hemos demostrado que la actividad CI de la proteína E y su PBM son determinantes para la virulencia del virus y se ha estudiado la relevancia de los motivos homólogos de la proteína 3a en replicación y patogénesis. La actividad CI de esta proteína se caracterizó en bicapas lipídicas artificiales mostrando que forma CIs no dependientes de voltaje, con baja selectividad por cationes en presencia de  $K^+$  y  $Na^+$  y poco significativa en presencia de  $Ca^{2+}$ . Se identificaron residuos esenciales para la actividad CI de la proteína 3a y se generaron mutantes del SARS-CoV 3a-CI<sup>-</sup> y sin el PBM de esta proteína. Nuestros resultados mostraron que ninguno de estos motivos era relevante para la virulencia del SARS-CoV en contraste a los dominios homólogos en la proteína E, indicando que hay una jerarquía entre las actividades CI y PBMs de estas vioporinas, siendo las de la proteína E más relevantes que las de la 3a. Además, se demostró la existencia de una complementación funcional entre los PBMs de las proteínas 3a y E. Se observó que los motivos PBM están filogenéticamente conservados en todos los géneros de CoVs, lo que indica una fuerte dependencia de los mismos para la supervivencia del virus. Se analizó la interacción de los 266 dominios PDZ humanos descritos, con los PBMs de las proteínas E y 3a del SARS-CoV y E y 5 de MERS-CoV mediante ensayos de doble híbrido de levadura (Y2H). La interacción del dominio carboxilo terminal de la proteína 3a con una librería de pulmón humano también se estudió utilizando la misma técnica. Se identificaron 30 proteínas con alta confianza en la interacción, entre las que se encuentran las proteínas PTPN13, PICK1, MYCBP2, NCOA6 o DLG1 que tienen en común su participación en la respuesta proinflamatoria, mediada predominantemente por la activación de NF- $\kappa$ B que es una causa esencial de la virulencia de SARS-CoV y MERS-CoV. Se están analizando rutas de señalización alternativas de la respuesta proinflamatoria mediada por estas proteínas con dominios PDZ. Los resultados muestran la alta complejidad de las interacciones CoV-hospedador y sugieren que una de las funciones de los PBMs de CoVs es interferir con el sistema inmune del huésped. Este trabajo muestra la alta relevancia de la actividad CI y, especialmente, de los PBMs en la replicación y virulencia de los CoVs, sugiriendo que estas actividades son dianas potenciales para la obtención de antivirales o de vacunas basadas en virus atenuados.

## **RESUMEN EN INGLÉS**

In 2003, a coronavirus (CoV) causing severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV) infected more than 8000 people from 26 countries with a 10% death rate. Viroporins are viral proteins displaying ion channel (IC) activity. SARS-CoV encodes three viroporins: 3a, E and 8a, of which 3a and E proteins also include a PDZ-binding-motif (PBM). PDZ domains are present in over 400 cellular proteins. Therefore, viruses that encode proteins with PBMs have the potential to change cell behavior. In this thesis, we have combined multidisciplinary approaches to study the relevance of SARS-CoV viroporins and more specifically, their IC activities and PBMs. We have demonstrated that SARS-CoV E protein IC activity and PBM are determinants of SARS-CoV virulence. Therefore, the relevance in virus replication and virulence of the IC activity and PBM of 3a protein was studied. 3a protein IC activity was characterized in planar lipid bilayers showing that it forms a non voltage-gated IC with low selectivity for cations in the presence of  $K^+$  and  $Na^+$  and with a non-significant selectivity in the presence of  $Ca^{2+}$ . Essential residues for 3a protein IC activity were identified and mutants missing 3a protein IC activity or PBM were generated. Our results showed that these motifs were not relevant for SARS-CoV virulence in contrast to those of the E protein. This indicates that there is a hierarchy between the IC activities and PBMs of these viroporins, being those of E protein more relevant than the ones of 3a protein. A functional complementation between the PBMs of SARS-CoV 3a and E proteins was also shown. We have described that the PBMs are phylogenetically conserved in all CoV genera indicating a strong dependence on these motifs for virus survival. The interaction between the 266 human PDZ domains and the PBMs of proteins E and 3a of SARS-CoV and proteins E and 5 of MERS-CoV was analyzed using yeast-two-hybrid (Y2H) assays. The interaction between the carboxy terminus domain of SARS-CoV 3a protein and a human lung gene library was studied using the same approach. 30 proteins were identified with high confidence including PTPN13, PICK1, MYCBP2, NCOA6 or DLG1. Most of them are involved in the inflammatory response, predominantly mediated by the activation of NF- $\kappa$ B, which is essential in the induction of SARS-CoV and MERS-CoV virulence. Alternative signaling pathways responsible for the pro-inflammatory response in which the identified PDZ proteins are involved are being currently studied. The results show the high complexity of CoV-host interactions and suggest that one of the functions of CoV PBMs is the alteration of the host immune system. This work shows the high relevance of the IC activity, and specially, the PBMs in CoVs replication and virulence, suggesting that they are potential targets for the development of antivirals and live attenuated vaccines.

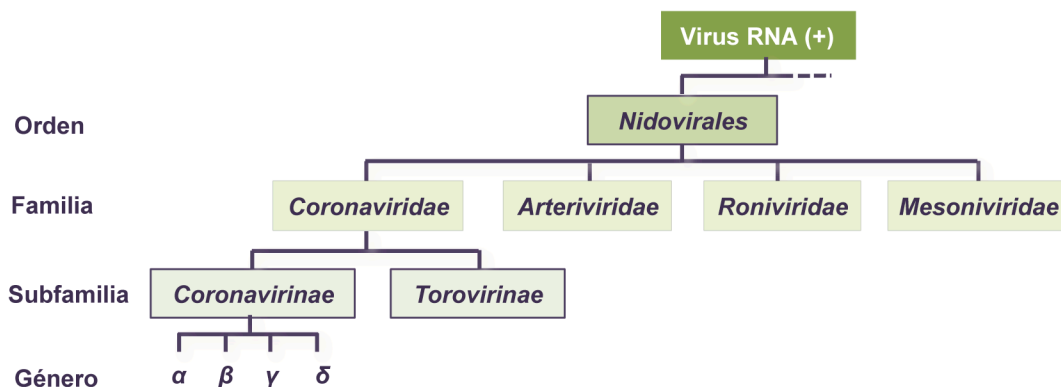
# INTRODUCCIÓN



## 1. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CORONAVIRUS

### 1.2 Clasificación taxonómica

Los coronavirus (CoVs) son virus con envuelta y un genoma RNA de polaridad positiva. Pertenecen a la familia *Coronaviridae*, incluida en el orden *Nidovirales*. Este orden comprende cuatro familias: *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Roniviridae* y *Mesoniviridae* (**Figura 1**). La característica común de los *Nidovirales*, es la producción de mRNAs subgenómicos 3' coterminales o anidados, que da el nombre al orden (Carstens, 2010; de Groot y col., 2012; Enjuanes y col., 2008b). La familia *Arteriviridae*, constituida por el género *Arterivirus*, incluye especies de virus que afectan a mamíferos, como el virus de la arteritis equina (EAV), que da nombre a la familia, o el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) (Lunney y col., 2010; Snijder y Spaan, 1995). Los componentes de las familias *Roniviridae* y *Mesoniviridae* infectan a organismos invertebrados como crustáceos y mosquitos, respectivamente (Lauber y col., 2012; Walker y col., 2005). La familia *Coronaviridae*, alberga a las subfamilias *Torovirinae*, formada por los géneros *Torovirus* y *Bafinivirus*, y *Coronavirinae* dividida a su vez en los géneros *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , respectivamente), que incluyen más de 20 especies que infectan vertebrados, entre ellos mamíferos y aves (de Groot y col., 2012). El género *Betacoronavirus*, incluye cuatro linajes (A, B, C y D). El CoV humano (HCoV) causante del síndrome respiratorio agudo y grave (SARS-CoV) pertenece al B (Drosten y col., 2003; Rota y col., 2003; Stadler y col., 2003).



**Figura 1. Taxonomía del orden Nidovirales.** La figura muestra las familias, subfamilias y géneros que componen el orden Nidovirales.

Actualmente, la hipótesis más extendida sobre el origen de los CoVs es que el virus ancestral infectó un murciélago y de ahí pasó a aves o viceversa. Después, desde el murciélago evolucionaría infectando a otras especies de murciélagos y otros mamíferos incluyendo humanos, dando lugar a los actuales géneros *Alfacoronavirus* y *Betacoronavirus*. Por el otro lado, desde las aves, el virus evolucionaría infectando otras especies de aves y

ocasionalmente, algunos mamíferos como el leopardo o la ballena beluga dando lugar a los *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* (Lau y col., 2015; Woo y col., 2009; Woo y col., 2012).

## **1.2. Epidemiología**

Los CoVs son patógenos que infectan a animales vertebrados causando principalmente patologías respiratorias o gastrointestinales de diversa consideración. Muchos de estos virus ocasionan importantes pérdidas económicas en explotaciones ganaderas a nivel mundial. El virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV) y, más recientemente, el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) y el *Deltacoronavirus* del cerdo (SCDV) causan patologías muy graves en el ganado porcino (Huang y col., 2013; Saif y Wesley, 1992; Song y Park, 2012; Zhang, 2014). Las explotaciones bovinas y aviares se ven también afectadas por estos virus, principalmente por el coronavirus bovino (BCoV) y el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), respectivamente (Cavanagh, 2005; Fukutomi y col., 1999). Además, estos patógenos causan enfermedades severas en animales de compañía (CoVs felino y canino) y de experimentación (CoVs murinos) (Perlman y Netland, 2009). Tradicionalmente, los CoVs humanos se asociaban con infecciones respiratorias leves. De hecho, los virus HCoV-229E y HCoV-OC43 son responsables del 15% de los resfriados comunes, y causantes ocasionales de enfermedades pulmonares más graves en recién nacidos, personas mayores o individuos inmunodeprimidos (Garbino y col., 2006; McIntosh y col., 1969). No obstante, la relevancia de estos virus aumentó radicalmente en el año 2002 con la aparición en China del CoV causante del síndrome respiratorio agudo y grave (SARS-CoV), que provocó una epidemia de proporciones mundiales con 8.422 enfermos diagnosticados en 32 países y que dejó un balance de 916 fallecidos (en torno al 10% de mortalidad) (Drosten y col., 2003; Rota y col., 2003). A partir de ese momento, se intensificaron los programas de vigilancia médica, identificándose otros dos nuevos CoVs humanos (HCoV-HKU1 y HCoV-NL63), con una elevada diseminación en la población humana, como los agentes responsables de numerosos casos de bronquiolitis y neumonías relativamente graves (Pyrce y col., 2007). La epidemia del SARS, fomentó además la búsqueda del posible reservorio animal del virus. Se identificaron CoVs muy similares al SARS-CoV en mapaches (*Nyctereutes procyonoides*), tejones chinos (*Melogale moschata*) y especialmente, en civetas (*Paguma larvata*) que se criaban en granjas y se comercializaban en mercados de las zonas de China en las que se desarrolló la epidemia como un alimento selecto. Sin embargo, en ejemplares silvestres de estos animales no se detectaron CoVs similares al SARS-CoV y, además, el análisis de diferentes aislados virales indicaba que el virus se estaba adaptando a las civetas análogamente a como ocurría con el SARS-CoV humano (Kan y col., 2005; Song y col., 2005). Estos hallazgos sugerían que las civetas, los tejones y los mapaches podrían ser un hospedador intermedio pero no el

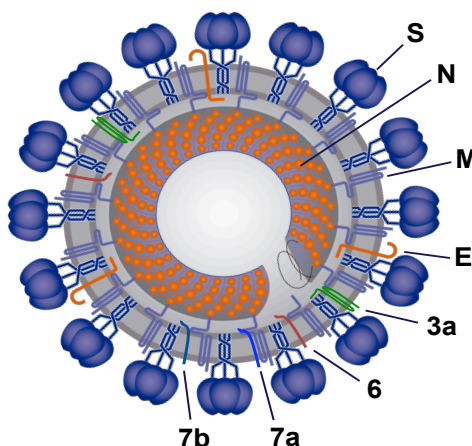
reservorio natural del patógeno. En 2005 se detectaron en murciélagos virus similares al SARS-CoV identificado en civetas y humanos (Lau y col., 2005; Li y col., 2005) pero hasta 2017 no se han encontrado poblaciones de murciélagos con virus tan parecidos al SARS-CoV que pudiesen ser considerados antecesores directos del mismo (Hu y col., 2017). Con todos estos datos se ha postulado que el virus habría pasado desde los murciélagos al hombre a través de las civetas, o incluso directamente de los murciélagos al hombre, sin utilizar las civetas como vector intermedio.

De hecho, el análisis masivo de muestras de murciélagos repartidos por varias zonas del planeta permitió identificar muchos virus similares a los CoVs que causaban otras patologías humanas o animales (Annan y col., 2013; Chu y col., 2008; Drexler y col., 2010; Falcon y col., 2011; Graham y col., 2013; Muller y col., 2007; Quan y col., 2010). Los murciélagos, con más de 1100 especies distribuidas todo el planeta, representan el reservorio natural de estos patógenos, y proporcionan el ambiente adecuado para que se den fenómenos de recombinación entre distintos CoVs, dando lugar a nuevos virus potencialmente peligrosos, capaces de infectar a los humanos o a otros animales. De hecho, recientemente, se ha sugerido la capacidad de algunos CoVs aislados de murciélago de infectar células de pulmón humano y producir enfermedad (Menachery y col., 2015). El acercamiento progresivo de los asentamientos humanos al hábitat de estos animales ha aumentado las probabilidades de la transmisión de enfermedades por salto entre especies. De hecho, en 2012, se identificó en Arabia Saudí un nuevo CoV (MERS-CoV), que emergió de los murciélagos (Annan y col., 2013) infectando humanos en los que causa neumonías graves acompañadas ocasionalmente de patología renal (Assiri y col., 2013). Por el momento, el MERS-CoV ha afectado a 2229 personas, distribuidas en 27 países principalmente de Oriente Medio, causando la muerte de 791 de ellas ([http://www.who.int/csr/disease/coronavirus\\_infections/en/](http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/en/)). Por esta razón se estima una mortalidad de más del 25%, si bien el número de casos continúa en aumento.

El gran reservorio animal detectado para los CoVs, junto con las últimas zoonosis causadas por estos patógenos, indican que los CoVs tienen cierta facilidad para cruzar la barrera de especie y adaptarse a los humanos, donde pueden ocasionar patologías moderadas, como sucede con el caso de los CoVs humanos HCoV-229E, el HCoV-OC43, el HCoV-NL63 y el HCoV-HKU1, o muy graves como las causadas por el SARS-CoV y el MERS-CoV (Graham y col., 2013). Por ello, el estudio de los mecanismos de la patogenicidad de estos virus, así como el desarrollo de terapias efectivas para su prevención es una prioridad en salud pública.

### 1.3. Estructura del virión

Los CoVs son virus esféricos de entre 120 y 160 nm de diámetro, que presentan una envuelta lipídica en la que se inserta un conjunto de proteínas estructurales comunes a todos los CoVs: Proteínas de la espícula (S), de membrana (M) y de la envuelta (E) (de Groot y col., 2012) (Figura 2).



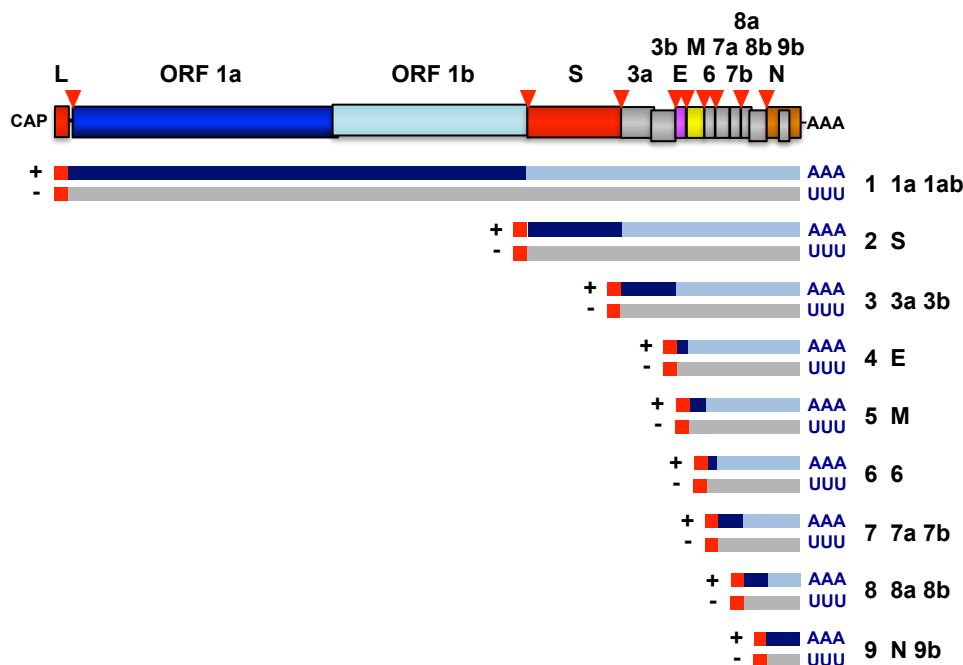
**Figura 2. Estructura del virión del SARS-CoV.** Representación gráfica de un virión del SARS-CoV. En la envuelta se insertan las proteínas S, M, E, comunes en todos los CoVs y además las proteínas 3a, 6, 7a y 7b, específicas del SARS-CoV. El interior del virus alberga la nucleocápsida, una estructura helicoidal formada por el genoma viral asociado a la proteína N.

La proteína S, encargada de mediar la unión al receptor celular, oligomeriza formando trímeros que confieren aspecto de corona al virión, lo que da nombre a estos virus (Gallagher y Buchmeier, 2001; Jimenez y col., 1986). La proteína M, implicada en los procesos de morfogénesis y ensamblaje viral (Nguyen y Hogue, 1997). La proteína E, es minoritaria en la partícula viral (20 moléculas / virión), pero en contraste abunda en las células infectadas, donde participa en la morfogénesis viral, junto con la proteína M (Nguyen y Hogue, 1997; Ruch y Machamer, 2012). Además, algunos *Betacoronavirus* presentan en la envuelta viral otras proteínas específicas de especie como las proteínas accesorias 3a, 6, 7a y 7b en el caso del SARS-CoV (Huang y col., 2006; Schaecher y col., 2007; Shen y col., 2005). El interior del virión contiene una cápsida helicoidal formada por la asociación entre el genoma del virus y la nucleoproteína (N) (Almazan y col., 2004; Lu y col., 2011; Thiel y col., 2003; Y. Ye y col., 2007; Zuñiga y col., 2007).

### 1.4. Estructura del genoma y expresión génica

El genoma viral es una molécula RNA de polaridad positiva de en torno a 30 kb (de Groot y col., 2012; Enjuanes y col., 2008b). Estructuralmente, el genoma de los CoV es muy similar a

los mRNAs celulares, dado que posee una estructura 7-metilguanosina (CAP) en su extremo 5' (Page y col., 1990), está poliadenilado en su extremo 3' (Jacobs y col., 1986) y presenta regiones no traducidas en ambos extremos (5'UTR y 3'UTR) de entre 210 y 530 nucleótidos de longitud (**Figura 3**).



**Figura 3. Expresión génica en el SARS-CoV.** Esquema del genoma del SARS-CoV (parte superior) donde se indican la estructura cap (CAP), la secuencia líder (L), los genes virales (ORF 1a, ORF 1b, S, 3a, 3b, E, M, 6, 7a, 7b, 8a, 8b, N y 9b), el poliA (AAA) y la posición de las secuencias reguladoras de la transcripción o TRS (triángulos rojos invertidos). La polimerasa viral genera durante el ciclo infeccioso una serie de RNAs virales (parte inferior), numerados del 1 al 9, de polaridad positiva y otros complementarios de polaridad negativa. En cada caso se indica los genes que codifican, las secuencias líder y antilíder (rojo), la secuencia codificante traducida (azul oscuro) y la secuencia codificante no traducida (azul claro).

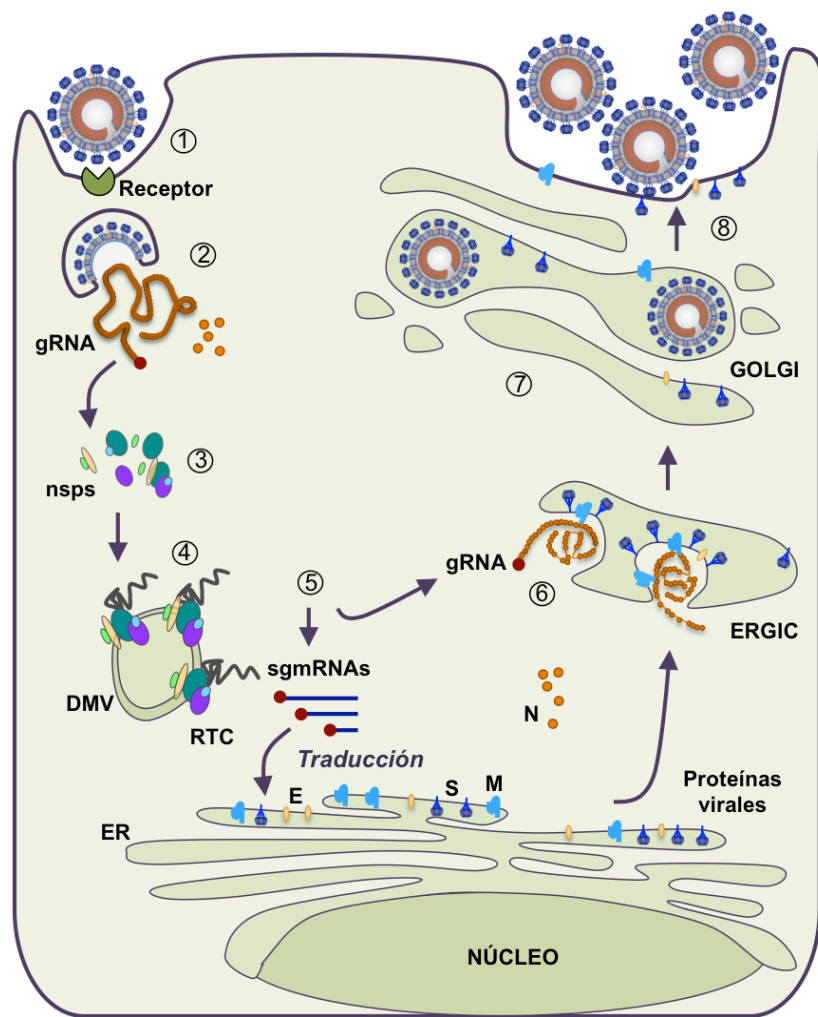
La organización básica del genoma es común a todos los miembros del orden *Nidovirales*. Aproximadamente, las dos terceras partes del genoma de los CoVs codifican la replicasa viral, constituida por las poliproteínas, pp1a y pp1b, de 500 y 800 kDa, respectivamente, que se procesan proteolíticamente para generar 16 proteínas no estructurales (nsps) implicadas en los procesos de replicación y transcripción (Gorbalenya y col., 1989; Ziebuhr, 2005; Ziebuhr y col., 2000). El tercio restante del genoma codifica las proteínas estructurales S, E, M y N y un conjunto de proteínas accesorias cuyo número e identidad difieren entre las distintas especies de CoV. El SARS-CoV consta de ocho proteínas accesorias: 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b (Narayanan y col., 2008).

Los genes del tercio 3' terminal del genoma, se expresan a partir de una colección de mRNAs subgenómicos (sgmRNAs) que son coterminales en sus extremos 5' y 3' (**Figura 3**). Estos sgmRNAs son estructuralmente policistrónicos pero funcionalmente monocistrónicos dado que, por lo general, únicamente se traduce la ORF más cercana al extremo 5' (Masters, 2006). Todos los sgmRNA presentan en su extremo 5' una secuencia líder, de 72 nucleótidos en el SARS-CoV, que también se encuentra en el extremo 5' del gRNA. Esta secuencia se incorpora a los sgmRNAs por un proceso de síntesis discontinua que es único en los virus RNA, en el que se generan moléculas intermediarias de polaridad negativa. Este proceso, está controlado por las secuencias TRS, formadas por un hexanucleótido central conservado (CS), flanqueado por secuencias variables 5' y 3'. Las TRSs se localizan en el extremo 3' del líder (TRS-L) y precediendo a cada uno de los genes virales (TRS-B, TRS del *body*) (Enjuanes y col., 2006b; Mateos-Gomez y col., 2013; Mateos-Gomez y col., 2011; Sola y col., 2011; Sola y col., 2005; Zuñiga y col., 2004).

La replicación del RNA genómico es un proceso de síntesis continua a través de un RNA intermediario de polaridad negativa, regulado principalmente por secuencias RNA en los extremos 5' y 3' del genoma (Sola y col., 2015).

### **1.5. Ciclo infectivo**

Los CoVs infectan principalmente células del tracto entérico y respiratorio (Miura y Holmes, 2009). El ciclo infectivo comienza con la unión de la proteína S al receptor celular, que en el caso del SARS-CoV es la enzima convertidora de angiotensina 2 humana (hACE-2) (Li y col., 2003; Wong y col., 2004), lo cual facilita la entrada del virus en la célula mediante endocitosis (**Figura 4**). Posteriormente, la membrana viral se fusiona con la membrana del endosoma, liberando la nucleocápsida en el citoplasma celular. Las ORFs 1a y 1b se traducen directamente desde el RNA genómico, generándose las poliproteínas pp1a y pp1ab que serán procesadas principalmente por proteasas virales, generando 16 nsps que, junto con la proteína N y proteínas celulares, forman el complejo de replicación-transcripción (RTC) (Ziebuhr, 2005). Este complejo se asocia con vesículas de doble membrana originadas a partir del retículo endoplasmático celular (RE) (Knoops y col., 2008) y lleva a cabo la replicación del genoma viral y la síntesis de los sgmRNAs, a través de moléculas de RNA intermediarias de polaridad negativa (Enjuanes y col., 2006a; Sawicki y Sawicki, 1990; Zuñiga y col., 2010).



**Figura 4. Ciclo infeccioso de los coronavirus.** La figura representa la infección de una célula, en la que se señalan los siguientes pasos del proceso: (1) Interacción del virión con el receptor celular y endocitosis. (2) Fusión de membranas viral y celular y liberación de la nucleocápsida. (3) Traducción y procesamiento proteolítico de las poliproteínas pp1a y pp1ab. (4) Asociación de los componentes de la replicasa en vesículas de doble membrana (VDM) y síntesis de RNAs virales. (5) Traducción de los RNAs virales y generación, entre otros componentes, de la proteína N, que se asocia al genoma viral, y de las proteínas M, S, y E, que se insertan en RE. (6) Gemación del virus en el ERGIC. (7) Maduración de los viriones. (8) Fusión de las vesículas con la membrana plasmática y liberación de la progenie viral.

A partir de los sgmRNAs se traducen las proteínas virales estructurales y accesorias. Las proteínas M, S y E se sintetizan e incorporan en la membrana del RE. La proteína M recluta a la proteína S, en su transporte hacia el compartimento intermedio entre el RE y el aparato de Golgi (ERGIC), y además se une a la proteína E (de Haan y col., 1999; Lim y Liu, 2001; Nguyen y Hogue, 1997). Paralelamente, la proteína N se asocia con el RNA genómico viral formando las nucleocápsidas helicoidales, que se incorporan en las partículas virales a través de la interacción entre la proteína N y el dominio carboxilo terminal de la proteína M. Esta

interacción conduce a la invaginación de la membrana del ERGIC alrededor de las nucleocápsidas, formando los viriones inmaduros (Narayanan y col., 2000). Los viriones progenie son transportados a través de las cisternas del aparato de Golgi, donde se produce su maduración conforme progresan a través de la ruta secretora. Finalmente, las vesículas cargadas de virus se fusionan con la membrana plasmática celular liberando la progenie viral al medio extracelular (Tooze y col., 1987).

## **2. EL SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO Y GRAVE**

### **2.1. Bases moleculares de la patología**

El síndrome respiratorio agudo y grave causado por el SARS-CoV se caracteriza por una neumonía atípica de curso muy heterogéneo, que en parte depende de la intensidad de la respuesta del hospedador a la infección (Tang, 2009). La enfermedad cursa inicialmente con fiebre, mialgia, malestar general, escalofríos, estornudos y ocasionalmente diarrea (Zhao y col., 2003). Dos tercios de los pacientes infectados sufren fiebres persistentes, taquipnea e hipoxemia, necesitando muchas veces su internamiento en la unidad de cuidados intensivos y respiración asistida. En el 10% de los pacientes jóvenes, o en más del 50% de los personas mayores de 65 años la enfermedad termina produciendo fallo respiratorio, fallo multiorgánico y sepsis que conduce a la muerte (Donnelly y col., 2003). Algunos marcadores asociados con un curso severo y fatal de la enfermedad incluyen además de la edad, el elevado número de neutrófilos y de lactato deshidrogenasa en suero (Tang, 2009).

El agente etiológico, SARS-CoV, replica fundamentalmente en el tracto respiratorio inferior. La carga viral en el tracto respiratorio superior alcanza su valor máximo a los 10 días después de la infección, cuando los síntomas de la enfermedad son ya muy evidentes (Peiris y col., 2003). Este hecho explica la baja transmisibilidad de la enfermedad en las etapas tempranas de la infección, haciendo que el número de infecciones secundarias por el SARS-CoV sea moderado, en torno a tres individuos por paciente (Lipsitch y col., 2003; Riley y col., 2003).

El análisis histopatológico de muestras de pulmón de pacientes fallecidos por el SARS reveló la presencia de daño alveolar difuso, descamación de los epitelios pulmonares, la formación de membranas hialinas y la acumulación de edema (Franks y col., 2003; Nicholls y col., 2003; Peiris y col., 2003). Estos rasgos también se han observado en pacientes que han fallecido a causa de la infección por MERS-CoV (Alsaad y col., 2018; Ng y col., 2016), aunque en este caso la patología es letal principalmente en pacientes con alteraciones en el sistema inmune. Estas patologías son conocidas como daño pulmonar agudo (ALI) que, en su forma más desarrollada es denominado síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS). El ARDS, ocasionado por infecciones virales u otras causas, afecta anualmente a más de 200.000

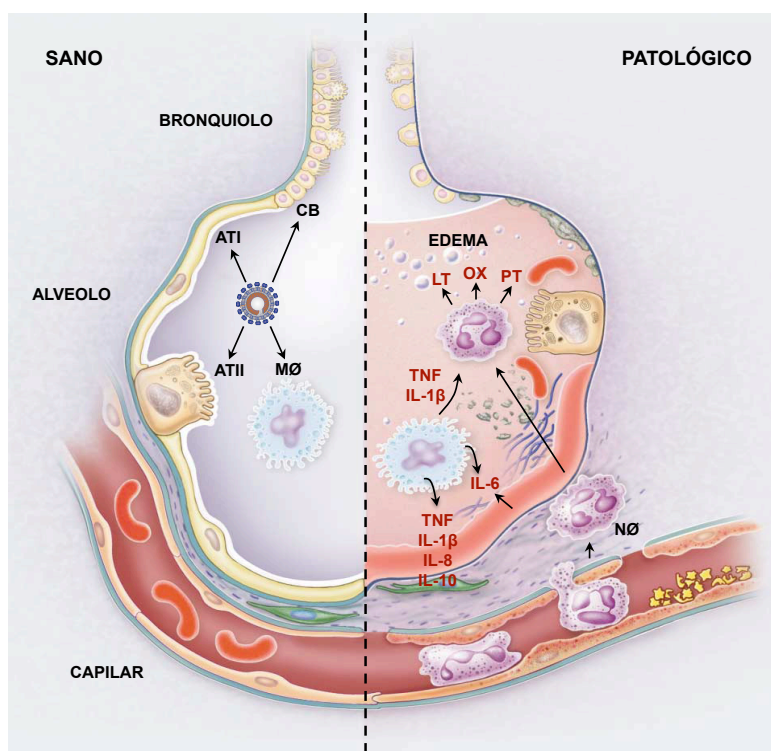


personas sólo en Estados Unidos, causando una mortalidad del 40% de los pacientes (Matthay y Zemans, 2011). La enfermedad se origina por la acumulación de un edema rico en proteínas en las vías respiratorias, que impide un intercambio gaseoso eficiente, ocasionando hipoxemia y eventualmente la muerte del individuo afectado. La acumulación de edema se desencadena por un aumento en la permeabilidad de los epitelios pulmonares y del endotelio vascular de este órgano, lo que permite la salida de líquido hacia los espacios aéreos. En el caso concreto del SARS-CoV, el virus infecta células bronquiales y bronquiolares, células alveolares de tipo I y II y, de forma menos productiva, macrófagos alveolares (**Figura 5**) (Frieman y col., 2008; Hsiao y col., 2005; Nicholls y col., 2006; Shieh y col., 2005; J. Ye y col., 2007). Los epitelios pulmonares infectados median la producción de citoquinas, que disparan una respuesta inflamatoria amplificada por los macrófagos. Las citoquinas atraen quimiotácticamente células leucocitarias, principalmente neutrófilos, hacia los focos de infección. Una vez allí, los neutrófilos liberan compuestos oxidantes, proteasas, leucotrienos y otras moléculas proinflamatorias. La extravasación masiva de neutrófilos a través del endotelio vascular, junto con la presencia de radicales libres y moléculas proinflamatorias, ocasiona el daño de los vasos sanguíneos que se vuelven permeables, permitiendo la salida de líquido hacia el parénquima pulmonar (Matthay y Zemans, 2011). En condiciones normales, los epitelios pulmonares controlan los niveles de líquido presentes en las vías aéreas, para permitir un intercambio gaseoso eficiente mediante la creación de un gradiente osmótico (Hollenhorst y col., 2011). Por esta razón, desempeñan un papel clave en la resolución del edema pulmonar y la superación del ARDS.

La infección por el SARS-CoV, la migración de neutrófilos y la producción de moléculas proinflamatorias lleva asociada la destrucción de las células del epitelio pulmonar y la alteración del transporte iónico. En estas condiciones, los epitelios pulmonares son incapaces de retirar el exceso de líquido de los espacios aéreos, donde también se acumulan restos celulares y moléculas señalizadoras, formando un edema rico en proteínas que impide el intercambio gaseoso (**Figura 5**).

## **2.2. Inmunopatología de la enfermedad**

Los síntomas del SARS se agravan a tiempos tardíos de la enfermedad, después incluso de que el virus se haya eliminado del organismo, lo cual refuerza que la enfermedad tiene un fuerte componente inmunopatológico (Perlman y Netland, 2009). Dentro del sistema inmune, la respuesta innata representa la primera línea de defensa frente a las infecciones virales, siendo la encargada de elaborar un proceso inflamatorio clave en la resolución de la infección y en la estimulación de la respuesta adaptativa, que participará más activamente en re-infecciones posteriores.



**Figura 5. Bases de la patología pulmonar causada por el SARS-CoV.** La figura representa la evolución de las vías aéreas después de la infección por el SARS-CoV. El virus infecta las células bronquiales (CB), células alveolares de tipo I (ATI), encargadas del intercambio gaseoso, células alveolares de tipo II (ATII), implicadas en la secreción del surfactante pulmonar y en la proliferación para reemplazar los epitelios dañados, y macrófagos alveolares (MØ), que participan en la defensa frente a sustancias extrañas. La infección causa la destrucción de los epitelios pulmonares, donde se promueve una respuesta inflamatoria amplificada por los macrófagos alveolares. En consecuencia, los neutrófilos (NØ) se extravasan desde los capilares sanguíneos a los espacios aéreos donde liberan leucotrienos (LT), compuestos oxidantes (OX) y proteasas (PT), potenciando aún más la respuesta inflamatoria. El aumento de la permeabilidad de los epitelios y endotelios causa la acumulación de edema en las vías aéreas.

El balance de los componentes pro- y anti-inflamatorios de la respuesta inmune inducida, es crítico en la evolución del proceso infeccioso y el desarrollo de la enfermedad. La descompensación de alguno de estos componentes puede conducir a la patología. SARS-CoV, MERS-CoV y otros virus respiratorios altamente patogénicos así como algunas cepas de gripe, provocan la activación de una respuesta proinflamatoria exacerbada en el parénquima pulmonar, asociada con la destrucción de las barreras epiteliales y la severidad de la enfermedad (Tisoncik y col., 2012).

En los pacientes del SARS particularmente, las citoquinas proinflamatorias de fase temprana IL-1 $\beta$  y TNF, de fase tardía IL-6, así como las quimioquinas CXCL10 y CCL2 y el IFN  $\gamma$ , juegan un papel predominante en la patología de la enfermedad, encontrándose niveles

aumentados de las mismas tanto a nivel local en el tejido pulmonar, como sistémico en el torrente sanguíneo (Tisoncik y col., 2012).

### **2.3. Modelos animales**

El establecimiento de modelos animales para el SARS-CoV ha supuesto un paso clave para el estudio de los mecanismos moleculares de la patogénesis viral y la búsqueda de terapias para la enfermedad. El SARS-CoV puede replicar de forma bastante eficiente en ratones, hámsters, hurones, gatos, civetas y primates, modelos que reproducen parcialmente los síntomas de la enfermedad humana. Los hámsters chinos y los hámsters *Golden Syrian* desarrollan pneumonitis, inflamación e infiltración de células inflamatorias en los pulmones. Muchas veces no se observan cambios patológicos en los pulmones, pero estos animales experimentan viremia y disminución de su actividad, aunque acaban recuperándose de la enfermedad (Roberts y col., 2005). En la actualidad el modelo más extendido por su fácil manejo, y por reproducir fielmente la mayoría de los aspectos de la patología humana, se basa en la utilización de ratones convencionales con un SARS-CoV adaptado a ratón. Para conseguir la adaptación en el modelo murino, se realizaron pases seriados de la cepa Urbani del SARS-CoV en pulmones de ratones BALB/c y se obtuvieron una serie de variantes evolucionadas: SARS-CoV-MA15, SARS-CoV-MA20 y SARS-CoV-v2163 (Day y col., 2009; Nagata y col., 2008; Roberts y col., 2007). En esta Tesis, se ha utilizado el virus SARS-CoV-MA15 y ratones BALB/c como modelo experimental. El SARS-CoV-MA15 posee 6 mutaciones puntuales en su genoma, comparado con el de la cepa Urbani, que afectan a las proteínas nsp5 (dos mutaciones), nsp9, nsp13, S y M (Roberts y col., 2007). Excluyendo la proteína nsp9, las regiones génicas que codifican el resto de proteínas evolucionaron incorporando cambios durante la adaptación del SARS-CoV a la población humana, lo que sugiere que son zonas implicadas en la adaptación específica (Chinese-Consortium, 2004). El SARS-CoV-MA15 induce muchas de las lesiones patológicas típicas del ARDS en ratón, causando una enfermedad respiratoria aguda, más grave en animales de edad avanzada y letal en muchos casos (Roberts y col., 2007).

### **2.4. Terapias**

Actualmente, no hay ninguna terapia aprobada para la infección por el SARS-CoV. Sin embargo, sí existen tratamientos antivirales y candidatos vacunales prometedores. En nuestro laboratorio se ha determinado que inhibidores de NF- $\kappa$ B y de la p38 MAPK disminuyen claramente la inflamación y la patogénesis inducida por el SARS-CoV en el modelo de ratón (DeDiego y col., 2014; Jimenez-Guardeño y col., 2014).

Muchos de los esfuerzos en la búsqueda de acciones terapéuticas se han centrado en el desarrollo de vacunas eficaces, seguras y funcionales en personas de edad avanzada,

especialmente susceptibles a la enfermedad causada por el SARS-CoV (Enjuanes y col., 2008a; Graham y col., 2013). Cabe destacar que nuestro grupo generó el primer candidato vacunal para el SARS-CoV utilizando un virus atenuado, el rSARS-CoV-ΔE. La inmunización con este virus confiere protección en hamsters, ratones transgénicos hACE2, y además, en ratones BALB/c de edad avanzada desafiados con el virus adaptado a ratón SARS-CoV-MA15 (Fett y col., 2013; Lamirande y col., 2008; Netland y col., 2010). El rSARS-CoV-ΔE induce la producción de altos títulos de anticuerpos neutralizantes así como una respuesta eficiente de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, resultando en una disminución del daño pulmonar, la inflamación, la acumulación de edema y la replicación viral después del desafío con el virus parental, aumentando muy significativamente la supervivencia de los animales (Fett y col., 2013). Este modelo, puede ser aplicable en el desarrollo de candidatos vacunales para otros CoVs altamente patogénicos como el MERS-CoV (Almazan y col., 2013) u otros virus emergentes, y servir como base para la obtención de vacunas más seguras mediante la introducción de otras mutaciones atenuantes en el genoma del virus.

### **3. PROTEÍNAS VIRALES CON ACTIVIDAD CANAL IÓNICO**

#### **3.1. Descripción y funciones**

El descubrimiento de numerosas proteínas con actividad canal iónico, especialmente representadas en los virus con genoma RNA (**Tabla I**), sugiere que la alteración de la homeostasis iónica celular es un requisito importante en las infecciones virales (Nieva y col., 2012). Virus humanos altamente patogénicos como los virus de la gripe A, de la inmunodeficiencia humana (HIV), del ébola (EBOV), de la hepatitis C (HCV) y varios picornavirus, entre otros, codifican al menos una de estas proteínas con actividad canal iónico denominadas vioporinas (de Jong y col., 2006; Ewart y col., 1996; Henkel y col., 2010; Pavlovic y col., 2003; Pinto y col., 1992). Las vioporinas son proteínas transmembrana que oligomerizan y aumentan la permeabilidad de las membranas celulares. Estas proteínas están implicadas principalmente en la producción viral, participando en diversas etapas del proceso como la entrada, el tráfico intracelular, la morfogénesis, la maduración y la liberación de los virus (Nieva y col., 2012).

Las células han desarrollado mecanismos para detectar las variaciones en su homeostasis iónica, inducidas por las infecciones virales, y responder en consecuencia. Recientemente, se ha descrito que la actividad canal iónico de la proteína M2 del virus de la gripe activa unos complejos macromoleculares, denominados inflamomas, implicados en la estimulación de la respuesta inmune innata (Ichinohe y col., 2010). La activación del inflamoma induce la producción de citoquinas inflamatorias como la interleuquina (IL)-1β y la IL-18, que incrementan la respuesta proinflamatoria. Este mecanismo novedoso de activación del

sistema inmune se ha descrito para otras vioporinas, como la PB1-F2 del virus de la gripe, la 2B del virus de la encefalomiocarditis, la proteína SH del RSV, la proteína E del PRRSV o, de forma más reciente, la E de SARS-CoV (Ito y col., 2012; McAuley y col., 2013; Nieto-Torres y col., 2013; Triantafilou y col., 2013; Zhang y col., 2013). El papel de las vioporinas en la virulencia de algunos virus está estimulando el interés de estas proteínas como posibles dianas terapéuticas (Gladue y col., 2012; Ichinohe y col., 2010; McAuley y col., 2013; Nieva y col., 2012). De hecho, los inhibidores de la actividad canal iónico de la proteína M2 del virus de la gripe amantadina y rimantadina se han utilizado en el tratamiento farmacológico de la enfermedad en humanos (Govorkova y Webster, 2010).

### **3.2. Proteínas de los coronavirus con actividad canal iónico**

Las proteínas con actividad canal iónico parecen jugar un papel importante especialmente en el ciclo de los CoVs. Se ha observado actividad canal iónico en la proteína E de SARS-CoV y de MERS-CoV (Liao y col., 2004; Surya y col., 2015). Además, se ha descrito la relevancia del dominio trans membrana (DTM) de la proteína E de los coronavirus, responsable de la actividad canal iónico, en la maduración y producción del virus. Por ejemplo, el intercambio del DTM de la proteína E de MHV por el de otros otros CoVs pertenecientes al género *Betacoronavirus* o *Gammacoronavirus*, mantiene una producción viral eficiente, lo cual no ocurre al intercambiar este dominio con el de la proteína E de un *Alfacoronavirus*. De ahí que se ha especulado que la selectividad del canal iónico característica de cada género de CoV podría ser relevante para producir la progenie viral (Kuo y col., 2006). Debido a la similitud de secuencias entre las distintas proteínas E de CoV, se ha sugerido que la mayoría de estas proteínas podrían tener actividad canal iónico al igual que las de SARS y MERS-CoV.

Más recientemente, se han descrito proteínas accesorias de coronavirus que también muestran actividad vioporina y que tienen un papel importante en replicación viral y en virulencia. Este es el caso de las proteínas 3 del PEDV, 4a del virus humano HCoV-229E y 12.9 del virus humano OC43 (Wang y col., 2012; Zhang y col., 2014; R. Zhang y col., 2015). Todas estas proteínas están codificadas en la región del genoma, situada entre las ORFs S y E. En esta región del genoma dependiendo de la especie de CoV, aparecen uno o varios genes que podrían codificar otras proteínas con actividad canal iónico entre las que se encuentra la proteína 3a de SARS-CoV o la 5 del MERS-CoV (Muller y col., 2010; Zeng y col., 2004). Se ha sugerido que la actividad CI de la proteína 3 del PEDV estaría implicada en virulencia dado que una cepa del virus con una delección de 49 nucleótidos en el gen 3, que elimina su actividad CI, no es virulenta (Wang y col., 2012). De forma similar, una variante del OC43 desprovista de la proteína 12.9 también está atenuada (R. Zhang y col., 2015).

Tabla I. Proteínas virales con actividad canal iónico

	GENOMA	FAMILIA	VIROPORINA-VIRUS
<b>VIRUS ANIMALES RNA</b>	RNA (+)	<i>Hepeviridae</i>	ORF3 – HEV <sup>1</sup>
	RNA (+)	<i>Retroviridae</i>	Vpu-HIV <sup>2</sup> p13 <sup>II</sup> -HTLV-1 <sup>3</sup>
	RNA (+)	<i>Picornaviridae</i>	2B-Enterovirus <sup>4</sup> 2B-ECMV <sup>5</sup> 2B-FMDV <sup>4</sup> VP4-RV <sup>6</sup>
	RNA (+)	<i>Arteriviridae</i>	E-PRRSV <sup>7</sup>
	RNA (+)	<i>Coronaviridae</i>	E, 3a, 8a-SARS-CoV <sup>8, 9, 10</sup> E-MHV <sup>11</sup> E-IBV <sup>12</sup> E, 4a-HCoV-229E <sup>13</sup> 3-PEDV <sup>14</sup> 12.9-HCoV-OC43 <sup>15</sup>
	RNA (+)	<i>Flaviviridae</i>	p7-HCV <sup>16</sup> NS2B-DENV <sup>17</sup> NS2B-JEV <sup>17</sup> p7-CSFV <sup>18</sup>
	RNA (+)	<i>Togaviridae</i>	6K-Virus Sindbis <sup>19</sup> 6K-Virus Ross River <sup>19</sup> 6K-Virus Semliki Forest <sup>19</sup>
	RNA (-)	<i>Orthomyxoviridae</i>	M2, PB1-F2-Virus Influenza A <sup>20</sup> BM2-Virus influenza B <sup>21</sup> CM2-Virus Influenza C <sup>22</sup>
	RNA (-)	<i>Paramyxoviridae</i>	SH - RSV <sup>23</sup>
	RNA (-)	<i>Filoviridae</i>	Delta Peptide – EBOV <sup>24</sup>
	RNA (-)	<i>Pneumoviridae</i>	SH-HMPV <sup>25</sup>
	RNA (-)	<i>Rhabdoviridae</i>	$\alpha$ 1-BEFV <sup>26</sup>
	dsRNA, lineal	<i>Reoviridae</i>	NS3-Virus de la lengua azul <sup>27</sup> Nsp4–Rotavirus <sup>28</sup> p35-ssRV <sup>29</sup>
<b>VIRUS ANIMALES DNA</b>	dsDNA, circular	<i>Hepadnaviridae</i>	HBx-HBV <sup>30</sup>
	dsDNA, circular	<i>Polyomaviridae</i>	Agnoproteína-JCV <sup>31</sup> VP4, VP2 & VP3-SV40 <sup>32</sup>
	dsDNA, lineal	<i>Papillomaviridae</i>	E5-HPV16 <sup>33</sup>
<b>VIRUS ALGAS DNA</b>	dsDNA, lineal	<i>Phycodnaviridae</i>	Kcv-ACTV-1 <sup>34</sup>

REFERENCIAS: <sup>1</sup>(Ding y col., 2017); <sup>2</sup>(Schubert y col., 1996); <sup>3</sup>(D'Agostino y col., 2005); <sup>4</sup>(Ao y col., 2015); <sup>5</sup>(Aldabe y col., 1997); <sup>6</sup>(Panjwani y col., 2014); <sup>7</sup>(Lee y col., 2006); <sup>8</sup>(Wilson y col., 2004); <sup>9</sup>(Lu y col., 2006); <sup>10</sup>(Chen y col., 2011); <sup>11</sup>(Madan y col., 2005); <sup>12</sup>(Wilson y col., 2006); <sup>13</sup>(Zhang y col., 2014); <sup>14</sup>(Wang y col., 2012); <sup>15</sup>(R. Zhang y col., 2015); <sup>16</sup>(Griffin y col., 2003); <sup>17</sup>(Leon-Juarez y col., 2016); <sup>18</sup>(Gladue y col., 2012); <sup>19</sup>(Melton y col., 2002); <sup>20</sup>(McAuley y col., 2013); <sup>21</sup>(Mould y col., 2003); <sup>22</sup>(Hongo y col., 2004); <sup>23</sup>(Gan y col., 2012); <sup>24</sup>(He y col., 2017); <sup>25</sup>(Masante y col., 2014); <sup>26</sup>(Joubert y col., 2014); <sup>27</sup>(Han y Harty, 2004); <sup>28</sup>(Crawford y col., 2012); <sup>29</sup>(Z. Zhang y col., 2015); <sup>30</sup>(Lee y col., 2017); <sup>31</sup>(Suzuki y col., 2010); <sup>32</sup>(Giorda y col., 2013); <sup>33</sup>(Wetherill y col., 2012); <sup>34</sup>(Plugge y col., 2000).

Curiosamente, la variante  $\Delta 12.9$  del OC43 puede alcanzar los títulos virales del virus parental si se proporcionan en trans viroporinas de otros coronavirus codificadas por el gen homólogo, como la proteína 3 de PEDV, 3a de SARS-CoV, 4a de HCoV-229E o la ORF3 del NL63 (R. Zhang y col., 2015), sugiriendo que estas proteínas tienen un papel redundante en la replicación viral de los coronavirus.

### **3.3. Proteínas del SARS-CoV con actividad canal iónico**

El SARS-CoV codifica tres viroporinas: las proteínas 3a, E y 8a. (Chen y col., 2011; Liao y col., 2004; Lu y col., 2006). Esto hace que el SARS-CoV sea un virus con un número muy alto de viroporinas.

La proteína E consta de 76 aminoácidos. Es una proteína integrada en la membrana solo tiene un DTM. Esta proteína se localiza en el ERGIC (Nieto-Torres y col., 2011). La relevancia de la actividad CI de la proteína E se ha estudiado anteriormente en nuestro laboratorio. Primero se identificaron los aminoácidos responsables de la actividad CI de la proteína E utilizando péptidos sintéticos con la secuencia de residuos correspondientes a su DTM y con mutaciones puntuales en estos aminoácidos (Verdia-Baguena y col., 2012). A continuación, se generó un SARS-CoV recombinante suprimiendo la actividad CI de la proteína E (rSARS-CoV-EIC<sup>-</sup>) introduciendo algunas de las mutaciones puntuales que eliminaron la actividad CI de péptidos con la secuencia del DTM de la proteína E (Verdia-Baguena y col., 2012). El análisis de este virus mostró que la actividad canal iónico de la proteína E se requería para la virulencia y para una óptima replicación del SARS-CoV (Nieto-Torres y col., 2014). Más recientemente, se describió que la proteína E promovía la patogenicidad viral provocando la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el ERGIC al citoplasma, activando el inflammasoma y liberando  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ . Esto daba lugar a una inflamación exacerbada que inducía edema y muerte de ratones BALB/c (Nieto-Torres y col., 2015b). Por otro lado, la proteína E también incluye un motivo de unión a dominios PDZ (PBM) formado por sus últimos cuatro aminoácidos (Jimenez-Guardeño y col., 2014; Teoh y col., 2010).

La proteína 3a es un componente estructural del virión del SARS-CoV compuesto por 274 aminoácidos y tres DTM. Es la proteína accesoria del SARS-CoV de mayor tamaño. La localización subcelular de esta proteína se ha estudiado mediante la sobre-expresión de la misma (Shen y col., 2005; Yuan y col., 2005), pero nunca en el contexto de la infección. La proteína 3a forma canales selectivos de  $\text{K}^+$  en oocitos de *Xenopus laevis* al tetramerizar a través de enlaces puente disulfuro intermoleculares (Lu y col., 2006). Se ha propuesto que esta proteína podría estar implicada en la liberación del virus (Lu y col., 2006) y patogénesis (Kanzawa y col., 2006). Sin embargo, la mayoría de los estudios con la proteína 3a se han realizado mediante su sobre-expresión y se conoce poco sobre la relevancia de la proteína 3a

en el contexto de la infección. La proteína 3a provoca cambios en la organización de las membranas de células infectadas llevando a un aumento de vesículas intracelulares que podrían ser usadas para la liberación no lítica de partículas virales (Freundt y col., 2010). Además, interacciona con la proteína M, que junto a la proteína E es esencial para el ensamblaje viral, indicando que la proteína 3a también podría ser relevante para el ensamblaje y morfogénesis del virus (Tan y col., 2004; Vennema y col., 1996). Adicionalmente, la proteína 3a induce una respuesta pro inflamatoria mediada por la ruta de NF- $\kappa$ B, que promueve la apoptosis celular (Kanzawa y col., 2006; Lu y col., 2006; Obitsu y col., 2009), lo cual podría tener un papel en la virulencia del virus. La proteína 3a también contiene un motivo PBM en su carboxilo terminal.

La proteína 8a del SARS-CoV es el resultado de una delección de 29 nucleótidos en la ORF8 que tuvo lugar durante la adaptación del virus desde antecesores virales que infectaban animales a humanos. Esta adaptación dividió el gen 8 en dos genes, 8a y 8b que codifican proteínas de 39 y 84 residuos respectivamente (Oostra y col., 2007). Ensayos sobreexpresando la proteína 8a del SARS-CoV mostraron que aumentaba la replicación viral y que inducía apoptosis a partir de una ruta de señalización mitocondrial (C. Y. Chen y col., 2007). Sin embargo, esta proteína no es esencial para la virulencia del virus, dado que al final de la epidemia del SARS se aislaron virus de pacientes con infecciones letales por el SARS-CoV, que presentaban una delección que eliminaba el gen 8 de su genoma (Chiu y col., 2005). La actividad canal iónico de la proteína 8a se ha descrito mediante modelos *in silico* (Chen y col., 2011).

## **4. LOS DOMINIOS PDZ**

### **4.1. Estructura y distribución**

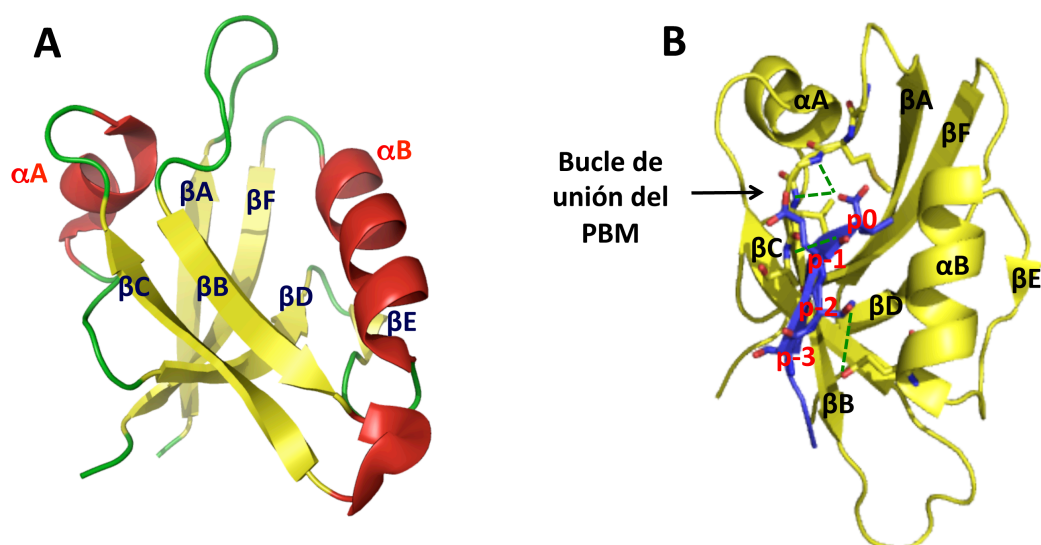
Los dominios PDZ son secuencias de interacción proteína-proteína consistentes en 80-90 aminoácidos que forman una estructura compuesta por un barril  $\beta$  antiparalelo formado por seis láminas  $\beta$  y dos hélices  $\alpha$  (**Figura 6A**) (Gerek y col., 2009). El término PDZ es un acrónimo formado por los nombres de las tres primeras proteínas donde se identificó este dominio: proteína de densidad postsináptica (PSD95), proteína supresora de tumores en *Drosophila* (DlgA) y la proteína zónula occludens-1 (ZO-1) (Kennedy, 1995). Las proteínas que contienen dominios PDZ se encuentran normalmente en el citoplasma celular o en asociación con la membrana plasmática y están implicadas en multitud de procesos biológicos como la formación de uniones celulares, regulación de la polaridad celular, migración celular, transporte y organización de proteínas y rutas de transducción de señales (Nourry y col., 2003). Los dominios PDZ se encuentran en cientos de proteínas, ya sea en células eucariotas como en eubacterias (Ponting, 1997). Solo en el genoma humano se han descrito 266



dominios PDZ formando parte de más de 400 proteínas distintas incluyendo sus isoformas (Luck y col., 2012; Nourry y col., 2003). Estas proteínas pueden tener desde uno hasta 13 dominios PDZ como es el caso de PICK1 o MUPP1, respectivamente. En algunos casos, los dominios PDZ pueden encontrarse dispuestos en tándem dentro de la misma proteína, a menos de 15 aminoácidos de distancia, y se ha sugerido que al estar situados tan próximos podrían actuar como una única unidad funcional (Luck y col., 2012). Los dominios PDZ interaccionan principalmente con secuencias específicas llamadas motivos de unión a PDZ (abreviado PBM por su denominación en inglés: *PDZ-binding motif*), aunque en menor medida también pueden interaccionar con otros PDZ e incluso con lípidos (Gallardo y col., 2010; Hillier y col., 1999). Se ha descrito que la mayor parte de los PBMs se encuentran localizadas en el extremo carboxilo terminal de las proteínas (Gerek y col., 2009; Hung y Sheng, 2002; Munz y col., 2012), aunque también existen PBMs internos que podrían ser más comunes de lo que se pensó originalmente (Lenfant y col., 2010). Curiosamente, algunas proteínas celulares como NHERF1 tienen dominios PDZ y PBM dentro de la misma proteína contribuyendo a regular la disponibilidad de ambos para interacciones inter-proteína (Bhattacharya y col., 2010). Los PBMs suelen ser secuencias específicas formadas por los últimos aminoácidos de la proteína que los contiene. Aunque existe controversia al respecto, los dominios PDZ pueden clasificarse en tres grupos distintos, según la secuencia del PBM que reconocen: Los dominios PDZ de clase I reconocen el motivo X-S/T-X- $\Phi$ -COOH (donde X es cualquier aminoácido y  $\Phi$  es un aminoácido hidrofóbico (normalmente V, I o L). Los dominios de clase II reconocen el motivo X- $\Phi$ -X- $\Phi$ -COOH y los dominios PDZ de clase III reconocen el motivo X-D/E-X- $\Phi$ -COOH. Sin embargo, también existen otros dominios PDZ que no se engloban en ninguno de estos grupos (Harris y Lim, 2001).

Estructuralmente, los PBMs se unen a los dominios PDZ mediante un fenómeno llamado adición- $\beta$  ( *$\beta$ -augmentation*) (Remaut y Waksman, 2006) por el cual el PBM se comporta como una nueva cadena  $\beta$  que se une de forma antiparalela con la cadena  $\beta_2$  de la lámina  $\beta$  de los dominios PDZ (**Figura 6B**). El grupo carboxilo del último aminoácido del PBM se une mediante puentes de hidrógeno a las amidas en las cadenas laterales de los aminoácidos que pertenecen al bucle  $\beta_1$ - $\beta_2$  del PDZ (“bucle de unión del PBM” en la **figura 6B**), de ahí que estos aminoácidos tengan gran influencia sobre la especificidad por uno u otro PBM. Sin embargo, cada vez más autores resaltan que las interacciones PBM-PDZ van más allá de los cuatro aminoácidos del PBM y del bucle  $\beta_1$ - $\beta_2$  del PDZ ya que los aminoácidos contiguos hacia el extremo amino terminal del PBM también interacciona con los del bucle  $\beta_2$ - $\beta_3$  de los dominios PDZ (Zhang y col., 2008). De hecho, dado que el bucle  $\beta_2$ - $\beta_3$  presenta una alta variabilidad tanto en longitud como en secuencia entre los distintos dominios PDZ, las interacciones descritas entre los PBM y los aminoácidos de este bucle son muy diversas. Por

esta razón, todavía no se ha logrado predecir de forma segura con qué PDZs va a interactuar un PBM dado (Luck y col., 2012).



**Figura 6. Estructura de los dominios PDZ. (A)** Modelo de la estructura secundaria de un dominio PDZ. Se indican las dos hélices  $\alpha$  en rojo ( $\alpha A$  y  $\alpha B$ ) y las 6 láminas  $\beta$  en amarillo ( $\beta A$ ,  $\beta B$ ,  $\beta C$ ,  $\beta D$ ,  $\beta E$  y  $\beta F$ ). **(B)** Se muestran la unión del dominio PDZ de AF6 (amarillo) con el PBM de Bcr (azul). Las líneas discontinuas de color verde muestran las interacciones establecidas entre los aminoácidos del PBM y del PDZ. Adaptada de (Q. Chen y col., 2007).

#### 4.2. Proteínas virales con motivos de unión a PDZ

Se han descrito varias proteínas virales que contienen PBMs cuya interacción con dominios PDZ durante la infección es relevante en la replicación o patogenicidad del virus (Javier y Rice, 2011) (**Tabla II**). Esta interacción puede tener diversas consecuencias en el hospedador, afectando a una variedad de procesos celulares de alta relevancia para los virus, modulando la replicación viral, la diseminación en el huésped y la patogénesis (James y Roberts, 2016; Javier y Rice, 2011). Los primeros PBMs virales se identificaron hace una década en oncoproteínas virales, como la proteína E6 del papilomavirus humano o la proteína tax del virus linfotrópico de células T humanas de tipo I (HTLV-1) (Kiyono y col., 1997; Rousset y col., 1998). En la actualidad se siguen descubriendo nuevas proteínas virales con motivos PBM como la ns4b del virus de la hepatitis C (HCV) o la E7 del papilomavirus de macaco (Hu y col., 2016; Tomaic y col., 2009). De hecho, en la actualidad se han identificado varias proteínas que incluyen dominios PDZ que interactúan con los PBMs de oncoproteínas virales así como algunos de los mecanismos celulares que se alteran como consecuencia de la interacción dando lugar a oncogénesis (James y Roberts, 2016).

**Tabla II. Proteínas virales con PBMs y los dominios PDZ con los que interaccionan**

FAMILIA	VIRUS	PROTEÍNA VIRAL	PROTEÍNA DIANA
<i>Adenoviridae</i>	Adenovirus humano	E4-ORF1	Dlg1 <sup>1</sup> , MAGI-1 <sup>1</sup> , MUPP1 <sup>1</sup> , PATJ <sup>1</sup> , ZO-2 <sup>1</sup>
<i>Hepadnaviridae</i>	HBV	Cápsida	GIPC <sup>2</sup> , PTPN3 <sup>3</sup>
	HCV	Ns4b	Scribble <sup>4</sup>
<i>Orthomyxoviridae</i>	Gripe A	NS1	Dlg1 <sup>5</sup> , MAGI-1 <sup>5</sup> , MAGI-2 <sup>5</sup> , MAGI-3 <sup>5</sup> , Scribble <sup>5</sup> , PDLIM2 <sup>6</sup>
<i>Papillomaviridae</i>	HPV	E6	GAL/GOPC <sup>7</sup> , Dlg1 <sup>7</sup> , Dlg4 <sup>7</sup> , MAGI-1 <sup>7</sup> , MAGI-2 <sup>7</sup> , MAIG-3 <sup>7</sup> , MUPP1 <sup>7</sup> , PATJ <sup>7</sup> , PTPN3 <sup>7</sup> , PTPN13 <sup>7</sup> , Scribble <sup>7</sup> , TIP-1 <sup>7</sup> , TIP-2/GIPC <sup>7</sup>
	RhPV	E7	Par3 <sup>8</sup>
<i>Retroviridae</i>	HTLV1	Tax	Dlg1 <sup>9</sup> , Scribble <sup>10</sup> , Pro-IL-16 <sup>11</sup> , $\beta$ 1-Syntrophin <sup>12</sup> , Dlg4 <sup>12</sup> , Lin-7 <sup>12</sup> , TIP-1 <sup>12</sup> , TIP2/GIPC <sup>12</sup> , TIP-40 <sup>12</sup> , MAGI-3 <sup>13</sup> , Erbin <sup>14</sup> , MAGI-1 <sup>15</sup>
		Env	Dlg1 <sup>16</sup>
<i>Flaviviridae</i>	TBEV	NS5	Scribble <sup>17</sup> , RIMS2 <sup>18</sup> , ZO-1 <sup>18</sup> , CASK <sup>19</sup> , GIPC <sup>19</sup> , ZO-2 <sup>19</sup> , GRIP2, Pro-IL-16 <sup>19</sup>
	DENV	NS5	ZO-1 <sup>18</sup>
	WNV	NS5	HtrA2 <sup>19</sup> , OMP25 <sup>19</sup> , CLIM1 <sup>19</sup> , ZO-2 <sup>19</sup> , PTPN13 <sup>19</sup> , PDLIM4 <sup>19</sup> , PDZD2 <sup>19</sup> , GRIP2 <sup>19</sup> , Scribble <sup>19</sup> , y otros <sup>19</sup>
<i>Rhabdoviridae</i>	Rabia	G	Dlg2 <sup>20</sup> , MAST2 <sup>20</sup> , MUPP1 <sup>20</sup> , PTPN4 <sup>20</sup>
<i>Poxviridae</i>	Virus de la vacuna de la viruela	F11	F11 <sup>21</sup>
<i>Coronaviridae</i>	SARS-CoV	E	PALS1 <sup>22</sup> , Sintenina <sup>23</sup>
		3a	?
		7b	?
	MERS-CoV	E	?
		5	?
		M	?

REFERENCIAS: <sup>1</sup>(Chung y col., 2007); <sup>2</sup>(Razanskas y Sasnauskas, 2010); <sup>3</sup>(Hsu y col., 2007); <sup>4</sup>(Hu y col., 2016); <sup>5</sup>(Liu y col., 2010); <sup>6</sup>(Yu y col., 2011); <sup>7</sup>(James y Roberts, 2016); <sup>8</sup>(Tomaic y col., 2009); <sup>9</sup>(Suzuki y col., 1999); <sup>10</sup>(Arpin-Andre y Mesnard, 2007); <sup>11</sup>(Wilson y col., 2003); <sup>12</sup>(Rousset y col., 1998); <sup>13</sup>(Ohashi y col., 2004); <sup>14</sup>(Song y col., 2009); <sup>15</sup>(Makokha y col., 2013); <sup>16</sup>(Blot y col., 2004); <sup>17</sup>(Werme y col., 2008); <sup>18</sup>(Ellencrona y col., 2009); <sup>19</sup>(Melik y col., 2012); <sup>20</sup>(Prehaud y col., 2010); <sup>21</sup>(Handa y col., 2013); <sup>22</sup>(Teoh y col., 2010); <sup>23</sup>(Jimenez-Guardeño y col., 2014).

Recientemente, se han descrito proteínas con PBMs en virus no oncogénicos, como la NS1 del virus de la gripe o la proteína NS5 del flavivirus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) (Melik y col., 2012; Obenauer y col., 2006).

La diversidad de los PBMs virales parece ser similar a la de los PBMs celulares ya que también se han descrito PBMs virales que no se encuentran en el extremo carboxilo terminal proteínas virales que tienen tanto un dominio PDZ como un PBM. Por ejemplo, la proteína NS5 del TBEV, posee un PBM en su extremo carboxilo terminal, al igual que sus homólogos en el virus Dengue (DENV) y en el virus del Nilo Occidental (WNV), y además un PBM interno en su dominio MTasa (Melik y col., 2012). Por otro lado, la proteína F11 del poxvirus de la vacuna posee tanto un PBM como un dominio PDZ, y ambos dominios están coordinados para promover la diseminación viral (Handa y col., 2013). Todo ello hace que la identificación de los motivos PDZ con los que interaccionan los PBMs virales se considere de alto interés.

#### **4.3. Proteínas de coronavirus con motivos de unión a PDZ**

En el caso de los coronavirus, la única proteína viral descrita cuyo PBM se ha estudiado en detalle es la proteína E del SARS-CoV, la cual se une a las proteínas Sintenina y PALS1 a través de su PBM. Las primeras evidencias de la presencia de un PBM en la proteína E del SARS-CoV se obtuvieron al expresarla en células, donde se identificó su interacción con la proteína 1 asociada con *Caenorhabditis elegans* lin-7 (PALS-1), una proteína celular implicada en la formación de uniones oclusivas mediadas por proteínas de membrana que contienen un dominio PDZ.

En células epiteliales infectadas por el SARS-CoV, la proteína E relocaliza a la proteína PALS1 en el ERGIC, alterando su localización original y retrasando la formación de las uniones oclusivas entre las células epiteliales y estableciendo la polaridad celular (Teoh y col., 2010). Estos estudios demostraron que los últimos cuatro aminoácidos de la proteína E forman un PBM que se une al dominio PDZ de la proteína PALS1. Sin embargo, la relevancia de este motivo durante la infección no se estudió. Por ello, en nuestro laboratorio se generaron virus recombinantes con distintas mutaciones en el PBM de la proteína E. Su análisis permitió demostrar que la interacción del PBM de la proteína E con el PDZ de la Sintenina durante la infección viral activaba la p38 MAPK. Esta interacción da lugar a la sobre-expresión de citoquinas proinflamatorias, causando la muerte del huésped debido a una respuesta inmune patológica (Jimenez-Guardeño y col., 2014). Más tarde se observó que el virus atenuado SARS-CoV-ΔE, después de varios pases en serie tanto en cultivos celulares como *in vivo*, revertía al fenotipo virulento mediante la incorporación de proteínas quiméricas que contenían nuevos PBMs, compensando así la pérdida del PBM de la proteína E (Jimenez-Guardeño y col., 2015).

Estos datos indican un claro papel de la interacción PBM-PDZ en la patología observada en pulmones de pacientes infectados por el SARS-CoV.

Pese a que la proteína E es la única proteína de CoV en la que la función de su PBM se ha estudiado en detalle (Jimenez-Guardeno y col., 2015; Jimenez-Guardeño y col., 2014; Teoh y col., 2010), existen PBMs funcionales en otras proteínas de CoVs, pero no se ha comprobado su relevancia en la patogenicidad del virus. Este es el caso del PBM de la proteína E del CoV OC43, cuya relevancia en la replicación y patogénesis del virus ha sido sugerida recientemente (Stodola y col., 2018). Otro ejemplo es el de la proteína 7b de FIPV cuyo PBM no se ha estudiado como tal pero que al ser modificado, altera la localización subcelular de esta proteína (Florek y col., 2017).

Dado que el SARS-CoV posee un PBM en la proteína 3a cuya relevancia todavía se desconoce, uno de los objetivos de esta tesis doctoral será el estudio de este motivo en la replicación y virulencia del SARS-CoV. Además, dado que se ha demostrado previamente la importancia del PBM de la proteína E del SARS-CoV en la patogenicidad del virus debido a su unión con la Sintenina, en esta tesis se estudiarán las proteínas con dominio PDZ con las que interaccionan las proteínas E y 3a del SARS-CoV y E y 5 del MERS-CoV, otro coronavirus altamente patogénico. Para ello, se utilizarán aproximaciones basadas en el doble híbrido de levadura (Y2H), primero usando una librería abierta compuesta por todos los genes de pulmón humano y después una librería más restrictiva compuesta por todos los dominios PDZ humanos descritos. Esta información será útil para definir si la virulencia de SARS-CoV y MERS-CoV está condicionada por la interacción de sus PBMs con los distintos dominios PDZ existentes en proteínas celulares o por la aidez de estas interacciones. Asimismo, también se estudiará la presencia de otros posibles PBMs en otras especies de CoVs.

En resumen, en esta tesis proponemos determinar la relevancia de motivos estructurales conservados en proteínas de los CoVs humanos mortales para el hombre: SARS-CoV y MERS-CoV.

## **OBJETIVOS**

Los CoVs son importantes patógenos humanos y animales, siendo el SARS-CoV y MERS-CoV los más letales para el hombre entre los conocidos. La patogenicidad de los virus no depende necesariamente del nivel de replicación de los mismos, sino de la presencia en su genoma de genes de virulencia. Previamente hemos demostrado que la proteína E del SARS-CoV es un factor de virulencia. En esta tesis se ha analizado la presencia de motivos de patogenicidad presentes en esta proteína de la envuelta viral y se han identificado dos motivos de virulencia: su actividad canal iónico y su motivo PBM de unión a dominios PDZ de proteínas celulares. Ambos motivos también están presentes en otra viroporina del SARS-CoV, la proteína 3a. Además, el SARS-CoV tiene una tercera viroporina, la proteína 8a, cuya relevancia en replicación y virulencia todavía no se ha estudiado. El objetivo principal de esta tesis es el análisis de la relevancia de las viroporinas del SARS-CoV en la patogénesis viral y de la relevancia de las interacciones de proteínas de CoVs conteniendo PBMs con proteínas celulares que incluyen dominios PDZ, dado que, utilizando esta estrategia, el virus puede controlar el funcionamiento de la célula huésped. Los objetivos específicos que se estudian en este trabajo son:

1. Análisis de la relevancia de las tres viroporinas completas del SARS-CoV en replicación y virulencia.
2. Estudio de la actividad canal iónico de la proteína 3a y localización de aminoácidos esenciales para esta actividad.
3. Análisis de la relevancia de la actividad canal iónico y PBM de la proteína 3a en replicación y virulencia del SARS-CoV.
4. Estudio de la interdependencia de las tres viroporinas presentes en el SARS-CoV: E, 3a y 8a, en la viabilidad viral.
5. Identificación de proteínas celulares que interaccionan con la proteína 3a.
6. Identificación de proteínas celulares con dominios PDZ que interaccionan con los PBMs de las proteínas E y 3a del SARS-CoV y con las proteínas E y 5 de MERS-CoV, y estudio de las posibles implicaciones funcionales de estas interacciones.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## **1. CÉLULAS EUCARIOTAS**

### **1.1. Líneas celulares**

La línea celular High Five (H5), derivada de células de ovario del gusano medidor del repollo (*Trichoplusia ni*), se obtuvo del laboratorio del doctor Antonio Alcamí (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, España). Las células Vero E6 derivadas de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), fueron cedidas por el doctor Eric Snijder (Centro Médico de la Universidad de Leiden, Holanda). Las células derivadas de riñón de hámster BHK-21 (BHK) fueron cedidas por el doctor Huber Laude (Unidad de Virología e Inmunología Molecular, Jouy-en-Josas, Francia).

### **1.2. Cultivo de células eucariotas**

Las células H5 se crecieron a 28°C en medio TC100 suplementado con suero bovino fetal descomplementado (FBS, Biowhittaker, Verviers, Belgium) al 10%, 50 µg/ml de gentamicina (Sigma), 0.25 µg/ml de anfotericina B (Sigma), 100 UI/ml de penicilina (Sigma), 100 µg/ml de estreptomycin (Sigma) y antimicótico al 0.02% (Sigma).

Las líneas celulares Vero E6 y BHK se crecieron a 37°C en una atmósfera con una humedad del 98% en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO) suplementado con 25 mM HEPES, 50 µg/ml de gentamicina (Sigma), 2 mM de L-glutamina (Sigma), aminoácidos no esenciales al 1% (Sigma) y 10% FBS.

Las líneas celulares se almacenaron mediante congelación en nitrógeno líquido a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células/ml en dimetil sulfoxido (Sigma) al 10% en FBS.

## **2. BACTERIAS**

### **2.1. Cepas y cultivos de bacterias**

Las células *Escherichia coli* DH10B [F<sup>-</sup> *mcr* A Δ(*mrr-hsdRMS-mcr*-BC) Ø80*dlacZ* ΔM15Δ*lacX74deoRrecA1endA1araD139(ara,leu)*7697*galUgalKλ-rpsLnupG*] que se utilizaron para el clonaje de los plásmidos, se obtuvieron de GIBCOBRL.

Los cultivos bacterianos se realizaron a 30 o 37°C en medio líquido Luria-Bertani (LB) (Sambrook y Russell, 2001), y a 37°C en placas de LB-agar para el aislamiento de colonias. El medio se suplementó con antibióticos (150 µg/ml de ampicilina o 12.5 µg/ml de cloranfenicol) para seleccionar colonias, cuando fue necesario.

## 2.2. Generación de bacterias competentes

Partiendo de una colonia de bacterias DH10B crecida en medio sólido, se inocularon dos litros de medio SOB (20 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 0.5 g/l NaCl, 0.18 g/l KCl) y las bacterias se amplificaron hasta alcanzar una  $DO_{550}$  de 0.7. Las bacterias se sedimentaron mediante centrifugación a  $4000\times g$  durante 15 min, y se lavaron tres veces con una solución de glicerol al 10% a 4°C, utilizando un volumen equivalente al del cultivo inicial en el primer lavado, y la mitad en los lavados sucesivos (2 l, 1 l y 0.5 l, respectivamente). Entre cada lavado, las bacterias se sedimentaron como se ha indicado anteriormente. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 6 ml de glicerol al 10%, y se alicuotearon para almacenarlas a -80°C hasta el momento de su utilización.

## 2.3. Transformación de bacterias

Las bacterias DH10B competentes se transformaron mediante electroporación con el DNA de interés. Se mezclaron 50 µl de bacterias con 50 µl de agua destilada y el DNA a transformar. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0.2 cm (Bio-Rad) y se aplicó un pulso eléctrico de 25 µF, 2.5 kV y 200 Ω utilizando un electroporador *GenePulser* (BioRad). Las bacterias se resuspendieron en 1 ml de medio LB y se mantuvieron durante 45 min a 37°C en agitación. Finalmente, las bacterias se sembraron por extensión en superficie sobre placas de LB-agar que contenían el antibiótico apropiado para la selección de colonias.

## 3. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA

### 3.1. Plásmidos

El bácmido con el genoma del baculovirus recombinante que codifica la proteína 3a de la cepa Urbani del SARS-CoV (rBV-3a) y sus mutantes fue generado por la doctora Grazyna Kochan (NavarraBiomed, Navarra). La construcción se realizó insertando el gen de la proteína 3a y sus variantes mutantes en un vector pFastBac (Invitrogen) quedando así fusionada en su extremo carboxilo terminal con una señal de corte para la proteasa del virus del grabado de tabaco (TEV) seguida de 10 residuos de histidina. Además, el gen de la proteína 3a queda bajo control del promotor de la polihedrina, para su posterior expresión en células de insecto y purificación.

El plásmido pBeloBAC11 (pBAC) (Wang y col., 1997) se utilizó para clonar el cDNA del SARS-CoV adaptado a ratón (MA15) (Fett y col., 2013) y sus variantes mutantes. Este plásmido de 7.5 kb contiene el origen de replicación del factor F de *Escherichia coli* (*oriS*), un gen de resistencia a cloranfenicol (*cat*) y una serie de genes necesarios para mantener una copia única del plásmido por célula bacteriana (*sopA*, *sopB*, *sopC*, y *repE*).

### 3.2. Purificación de plásmidos y fragmentos de DNA

Para la purificación de plásmidos a partir de cultivos bacterianos a pequeña, mediana o gran escala, se utilizaron respectivamente los reactivos *Plasmid mini, midi o maxi kits* (QIAGEN) según el protocolo del fabricante, con las modificaciones adecuadas en función del tamaño y número de copias del plásmido.

Para la purificación de plásmidos basados en pBAC se utilizó el reactivo *Large-Construct kit* (QIAGEN). Se partió de cultivos bacterianos crecidos a 30°C en 450 ml de medio LB suplementado con 12.5 µg/ml de cloranfenicol.

Para la purificación de DNAs amplificados a partir de PCR y fragmentos de DNA extraídos de geles de agarosa se utilizó el reactivo *QIAquick gel extraction kit* (QIAGEN) o el reactivo *QIAEX II* (QIAGEN) en el caso de fragmentos mayores de 10 kb, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante en cada caso.

### 3.3. Enzimas de restricción y ligación del DNA

Las enzimas de restricción se adquirieron de Roche o New England Biolabs. Para la ligación de moléculas de DNA se utilizó la enzima DNA ligasa del fago T4 (Roche). Todas las reacciones enzimáticas se realizaron siguiendo los protocolos previamente especificados (Sambrook y Russell, 2001).

### 3.4. Amplificación del DNA mediante PCR

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando 2.5 U de las enzimas *Amplitaq DNA polymerase* (Applied Biosystems) o *Vent polymerase* (New England Biolabs) para fines analíticos o preparativos, respectivamente. A diferencia de la *Amplitaq DNA polymerase*, la enzima *Vent polymerase* posee actividad exonucleasa correctora de errores 3'-5' y por lo tanto mayor fidelidad. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador *2720 Thermal cycler* (Applied Biosystems) utilizando un volumen de 50 µl en presencia de 20 pmoles de los oligonucleótidos correspondientes (Sigma), una mezcla de deoxinucleótidos trifosfato (Roche) a una concentración final de 0.25 mM, 1.25 mM de MgCl<sub>2</sub> para *Amplitaq DNA polymerase* o MgSO<sub>4</sub> para *Vent polymerase*, sus correspondientes tampones de reacción y entre 25 y 50 ng de DNA molde por reacción. La temperatura de fusión de los oligonucleótidos (T<sub>m</sub>) y la longitud del fragmento a amplificar determinaron la temperatura de anillamiento (entre 5 y 10°C inferior a la menor T<sub>m</sub> de los oligonucleótidos empleados) y el tiempo de elongación (aproximadamente 1 kb de DNA por minuto a 72°C), respectivamente. En todos los casos se utilizaron entre 25 y 35 ciclos de amplificación. Para la amplificación de la región del genoma que incluía gen 3a del SARS-CoV (del nucleótido 26017 al 26447) se utilizaron los oligonucleótidos 24937-VS

(GGCGACATTTTCAGGCATTAACGC) y 26086-RS (GGCACGCTAGTAGTCGTCGTCGGC). Para amplificar la región del genoma correspondiente al gen E (del nucleótido 26017-26447) se utilizaron los oligonucleótidos E-VS (CTCTTCAGGAGTTGCTAATCCAGCAATGG) y E-RS (TCCAGGAGTTGTTTAAGCTCCTCAACGGTA). Para la región que corresponde al gen 8a (del nucleótido 27779-27898) se utilizaron los oligonucleótidos SARS-27545-VS (GGAGGTTCAACAAGAGCTCTACTCGCC) y SARS-28008-RS (GACAGTTGATAGTAACATTAGGTGTGC). El ensamblamiento de las secuencias y la comparación con la secuencia consenso se realizó utilizando el programa SeqMan (Lasergnee, Madison, WI).

### **3.5. Electroforesis del DNA en geles de agarosa**

La separación de fragmentos de DNA para estudios analíticos y su purificación, se realizó en geles de agarosa D-1 *Medio EEO* (Pronadisa) al 0.7-1.2% disuelta en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA). Se añadió *SYBR® Safe DNA gel stain 1x* (Life technologies) para visualizar las bandas de DNA utilizando el captador de imágenes *ChemiDoc™* (Biorad).

## **4. OBTENCIÓN DE SARS-CoVs RECOMBINANTES**

### **4.1. Manipulación del SARS-CoV en cultivos celulares**

Todo el trabajo con virus infecciosos fue aprobado por el Ministerio de Medio Ambiente (resolución 001/36438). La manipulación del virus en cultivos celulares se realizó en un laboratorio de bioseguridad con nivel de contención 3 (CNB, CSIC). El laboratorio está equipado con los medios e infraestructuras necesarias, incluyendo un sistema de tratamiento de aire y de inactivación biológica de efluentes líquidos. Además, el operador está permanentemente protegido con un sistema de filtración de aire *HEPA Airmate* (3M) y la vestimenta adecuada, compuesta por monos y calzas de protección (Tyvek) y varios pares de guantes.

Los siguientes virus utilizados en los experimentos de esta tesis, se generaron y rescataron previamente en el laboratorio: SARS-CoV recombinante adaptado a ratón (rSARS-CoV-MA15) (Roberts y col., 2007), el mutante de delección carente del gen E (rSARS-CoV-ΔE) (DeDiego y col., 2007), los mutantes con pequeñas mutaciones a lo largo del gen de la proteína E (rSARS-CoV-EΔ1, -EΔ2, -EΔ3, -EΔ4, -EΔ5, -EΔ6) (Regla-Nava y col., 2015) y los mutantes carentes del canal iónico (rSARS-CoV-E<sub>IC</sub><sup>-</sup>) y el PBM de la proteína E (rSARS-CoV-EPBM<sup>-</sup>) (Jimenez-Guardeño y col., 2014; Nieto-Torres y col., 2014).

## 4.2. Construcción de cDNAs infectivos

El cDNA del SARS-CoV-MA15 ensamblado en el pBAC (pBAC-SARS-CoV-MA15) (Fett y col., 2013), se utilizó como base para introducir las mutaciones correspondientes afectando a las viroporinas del SARS-CoV E, 3a y 8a. Para realizar el mutante de delección de la proteína 3a se realizó una PCR solapante generando un fragmento de DNA que incluía los nucleótidos del 24937 al 26060 del genoma del SARS-CoV flanqueados por los sitios de restricción *SwaI* y *BamHI* utilizando los oligos indicados en la **Tabla III**. De esta manera, se introdujo una delección en los nucleótidos del 25270-25668 del genoma del SARS-CoV que eliminaba la porción del gen 3a que no solapa con el gen 3b. Además, en este fragmento de PCR también se introdujeron mutaciones a lo largo del resto del gen incluyendo la supresión del codón de inicio del gen 3a, la introducción de dos codones de parada en las posiciones 25673, 25683 y la eliminación de un potencial codón de inicio en la posición 26042. Este fragmento se digirió con las enzimas *SwaI* y *BamHI* y se insertó en el plásmido intermedio pBAC-*PmeI*-*BamHI*-SARS-CoV que contiene los nucleótidos 18407-26044 del clon infectivo del SARS-CoV obteniendo el plásmido pBAC-*PmeI*-*BamHI*-SARS-CoV-Δ3a. A continuación, se digirió este plásmido con las enzimas *PmeI* y *BamHI* y el fragmento conteniendo la delección se insertó en el plásmido pBAC-SARS-CoV-MA15 digerido con las mismas enzimas obteniendo el plásmido pBAC-SARS-CoV-MA15-Δ3a.

El mutante de la proteína 8a se realizó mediante PCR solapante generando los fragmentos de DNA que incluían los nucleótidos del 26790 al 28753 del genoma del SARS-CoV-MA15 flanqueados por los sitios de restricción *XcmI* y *NheI* utilizando los oligos indicados en la **Tabla III**.

De esta manera, se introdujo una delección de 82 nucleótidos en la ORF8 que eliminaba la porción del gen 8a que no solapa con el gen de la 8b. Este fragmento se digirió con las enzimas *XcmI* y *NheI* y se insertó en el plásmido intermedio pBAC-*BamHI*-*RsrII*-SARS-CoV que contiene los nucleótidos 26044-29782 del clon infectivo del virus obteniendo el plásmido pBAC-*BamHI*-*RsrII*-SARS-CoV-Δ8a. A continuación, se digirió este plásmido con las enzimas *BamHI* y *RsrII* y el fragmento conteniendo la delección se insertó en el plásmido pBAC-SARS-CoV-MA15 digerido con las mismas enzimas obteniendo el plásmido pBAC-SARS-CoV-MA15-Δ8a. Para realizar los mutantes del canal iónico de la proteína 3a, se generaron fragmentos de DNA que incluían los nucleótidos del 25016 al 26044 del genoma del SARS-CoV-MA15 flanqueados por los sitios de restricción *SwaI* y *BamHI*, mediante PCR solapante utilizando los oligonucleótidos indicados en la **Tabla III**. Estos fragmentos llevaban distintas mutaciones localizadas en el gen 3a que generaban cambios de aminoácidos afectando a los DTMs de la proteína, donde se localiza el canal iónico: S40A (TCA por GCA), S48A (AGC por GCC), Y91A (TAT por GCT), H93A (CAT por GCT), Y109A (TAT por GCT), Y113A (TAT por

GCT), Q116A (CAA por GCA), TMD1-(incluyendo las mutaciones S40A y S48A), TMD2-(incluyendo las mutaciones Y91A, H93A), TMD3- (incluyendo las mutaciones Y109A, Y113A, Q116A) y TMD[2,3]- (incluye las mutaciones Y91A, H93A, Y109A, Y113A y Q116A). Los fragmentos resultantes de la PCR solapante se digirieron con las enzimas *SwaI* y *BamHI* y se introdujeron en el plásmido intermedio pBAC-*PmeI*-*BamHI*-SARS-CoV que contiene los nucleótidos 18407-26044 del clon infectivo del SARS-CoV. Después, los plásmidos intermedios con la mutación correspondiente se digirieron con las enzimas *PmeI* y *BamHI* y se insertaron en el plásmido pBAC-SARS-CoV-MA15 digerido con estas mismas enzimas para obtener el clon infectivo con la mutación correspondiente. Para realizar el mutante del motivo PBM de la proteína 3a se realizó una PCR que resultó en un fragmento de DNA con la secuencia de nucleótidos 26044-26790 flanqueada por las dianas de restricción *BamHI* y *XcmI* utilizando los oligos indicados en la **Tabla III**. La mutación introducida modifica el PBM de la proteína 3a introduciendo mutaciones silenciosas en el gen de la 3b con el que solapa. De esta manera, la secuencia principal del motivo PBM de la proteína 3a (SVPL) con la secuencia de nucleótidos AGCGTGCCTTTG, es suprimida al introducir esta secuencia alternativa (GMSM) con los nucleótidos GGCATGTCTATG. El fragmento resultante de la PCR se digirió con las enzimas *BamHI* y *XcmI* y se introdujeron en el plásmido intermedio pBAC-*BamHI*-*RsrII*-SARS-CoV que contiene los nucleótidos 26044-29782 del clon infectivo del virus obteniendo el plásmido pBAC-*BamHI*-*RsrII*-SARS-CoV-3amutPBM. Después se digirió este plásmido con las enzimas *BamHI* y *RsrII* y el fragmento conteniendo la delección se insertó en el plásmido pBAC-SARS-CoV-MA15 digerido con las mismas enzimas obteniendo el plásmido pBAC-SARS-CoV-MA15-3amutPBM.

Los virus que combinan la delección del gen 3a con pequeñas delecciones a lo largo del gen E se realizaron digiriendo los plásmidos pBAC-SARS-CoV-MA15-E $\Delta$ 1, -E $\Delta$ 2, -E $\Delta$ 3, -E $\Delta$ 4, -E $\Delta$ 5, -E $\Delta$ 6 con las enzimas de restricción *BamHI* y *RsrII* e insertando el fragmento resultante con la mutación en un plásmido pBAC-SARS-CoV-MA15- $\Delta$ 3a previamente digerido con las mismas enzimas. En todos los casos, la integridad del DNA clonado se verificó mediante análisis de restricción con la enzima *HindIII* y secuenciación.

**Tabla III. Secuencia de los oligos utilizados**

Mutante	PCR	Nombre del primer	Secuencia del primer
Δ3a	1	SARS-24937-VS SARS-25235-Δ3a-RS	GGCGACATTTTCAGGCATTAACGC CATCATAAAGTTATGGGTTCTAGGATTATAAGTTCGTTTATGTG TAATGTAATTTGACACCC
	2	SARS-25261-Δ3a-VS SARS-26060-Δ3a-RS	CGAAGCTTATAATCTAGAACCCATAACTTTATGATGCC CATCATAAATTGGATCCACTGCTGGATTAGCAACTCCTG
Δ8a	1	SARS-26788-VS SARS-Δ8a-RS	CCGGGGGACAATTGTGACCAGAC GGATCTTCAAGCACATGTTCTGTTAGACTTTGGTACAAGGTTCTT CTAGATCC
	2	SARS-Δ8a-VS SARS-28757-RS	CCAAAGTCTAAACGAACATGTGCTTGAAGATCCTTGTAAAGGTACA ACACTAGG GGGCAGTTTACCACCTCCGCTAGC
TMD1-	1	SARS-24936-VS SARS_3a_TMD1_-RS	GGCGACATTTTCAGGCATTAACGCTTCTGTGCG CGGCTGAAAAACAGCAAGAAATGCAACGCCAATAACAAGCCATC CGAAAGGGAGTGCGGCTTGTAGCGGTATC
	2	SARS_3a_TMD1_-VS SARS-26086-RS	CGCACTCCCTTTTCGGATGGCTTGTATTGGCGTTGCATTCTTGC TGTTTTTCAGCGCGCTACCAAAATAAT GGCAGCTAGTAGTCGTCGTCGGC
TMD2-	1	SARS-24936-VS SARS_3a_TMD2_-RS	GGCGACATTTTCAGGCATTAACGCTTCTGTGCG CAAAAATTGCGCCTCCATACCTGCAGCGACAAGCAAAAGAGCTGA AGCGATGGTAACAAATAGCAGC
	2	SARS-25546-VS SARS-26086-RS	TCTTTTGCTTGTGCTGCAGGTATGGAGGCGCAATTTTTG GGCAGCTAGTAGTCGTCGTCGGC
TMD3-	1	SARS-24936-VS SARS-25586-RS	GGCGACATTTTCAGGCATTAACGCTTCTGTGCG CAAAAATTGCGCCTCCATACCTGCAGCGACAAGCAAAAGA TCTTTTGCTTGTGCTGCAGGTATGGAGGCGCAATTTTTGTACCT CGCTGCCTTGATAGCTTTTCTAGCATGCATCAACGCATGTAGA GGCAGCTAGTAGTCGTCGTCGGC
	2	SARS-TMD3-VS SARS-26086-RS	
TMD[2,3]-	1	SARS-24936-VS SARS-TMD2-RS	GGCGACATTTTCAGGCATTAACGCTTCTGTGCG CAAAAATTGCGCCTCCATACCTGCAGCGACAAGCAAAAGAGCTGA AGCGATGGTAACAAATAGCAGC
	2	SARS-TMD3-VS SARS-26086-RS	TCTTTTGCTTGTGCTGCAGGTATGGAGGCGCAATTTTTGTACCT CGCTGCCTTGATAGCTTTTCTAGCATGCATCAACGCATGTAGA GGCAGCTAGTAGTCGTCGTCGGC
3a-Y91A	1	SARS-24936-VS SARS-3a-Y91A-RS	GGCGACATTTTCAGGCATTAACGCTTCTGTGCG CAAAAATTGCGCCTCCATACCTGCAGCGACAAGCAAAAGATGTGA AGCGATGGTAACAAATAGCAGC
	2	SARS-25546-VS SARS-26086-RS	TCTTTTGCTTGTGCTGCAGGTATGGAGGCGCAATTTTTG GGCAGCTAGTAGTCGTCGTCGGC
3a-H93A	1	SARS-24936-VS SARS-3a-H93A-RS	GGCGACATTTTCAGGCATTAACGCTTCTGTGCG CAAAAATTGCGCCTCCATACCTGCAGCGACAAGCAAAAGAGCTGA ATAGATGGTAACAAATAGCAGC
	2	SARS-25546-VS SARS-26086-RS	TCTTTTGCTTGTGCTGCAGGTATGGAGGCGCAATTTTTG GGCAGCTAGTAGTCGTCGTCGGC
3a-Y109A	1	SARS-24936-VS SARS-25586-RS	GGCGACATTTTCAGGCATTAACGCTTCTGTGCG CAAAAATTGCGCCTCCATACCTGCAGCGACAAGCAAAAGA TCTTTTGCTTGTGCTGCAGGTATGGAGGCGCAATTTTTGTACCT CGCTGCCTTGATATATTTTCTACAATGCATCAACGCATGTAGA GGCAGCTAGTAGTCGTCGTCGGC
	2	SARS-Y109A-VS SARS-26086-RS	
3a-Y113A	1	SARS-24936-VS SARS-25586-RS	GGCGACATTTTCAGGCATTAACGCTTCTGTGCG CAAAAATTGCGCCTCCATACCTGCAGCGACAAGCAAAAGA TCTTTTGCTTGTGCTGCAGGTATGGAGGCGCAATTTTTGTACCT CTATGCCTTGATAGCTTTTCTACAATGCATCAACGCATGTAGA GGCAGCTAGTAGTCGTCGTCGGC
	2	SARS-Y113A-VS SARS-26086-RS	
3a-Q116A	1	SARS-24936-VS SARS-25586-RS	GGCGACATTTTCAGGCATTAACGCTTCTGTGCG CAAAAATTGCGCCTCCATACCTGCAGCGACAAGCAAAAGA TCTTTTGCTTGTGCTGCAGGTATGGAGGCGCAATTTTTGTACCT CTATGCCTTGATATATTTTCTAGCATGCATCAACGCATGTAGA GGCAGCTAGTAGTCGTCGTCGGC
	2	SARS-Q116A-VS SARS-26086-RS	
3a-PBM-	1	SARS-3amutPBM-VS SARS-26885-RS	GGATCCAATTTATGATGAGCCGACGACGACTACTGGCATGTCTAT GTAAGCACAAAGAAAGTGAGTA GGTCCTTAATGTACAGCGCCC

### **4.3. Transfección y rescate de SARS-CoVs recombinantes**

Las células BHK crecidas a un 95% de confluencia en frascos de 12.5 cm<sup>2</sup> se transfectaron con 6 µg del cDNA de los clones infectivos y 18 µl de *Lipofectamine 2000* (Life technologies), de acuerdo con las especificaciones del proveedor. A las 6 horas después de la transfección (hdt), las células se tripsinizaron, se añadieron sobre monocapas de células Vero E6 confluentes crecidas en frascos de 12.5 cm<sup>2</sup> y se incubaron a 37°C. A las 72 horas se recogieron los sobrenadantes, se pasaron una vez más en células Vero E6 y los virus recuperados se clonaron mediante tres pasos de purificación de placas de lisis en medio DMEM semi-sólido que contenía 0.6% de agarosa de bajo punto de electroendoosmosis (Pronadisa, Madrid). Los virus clonados se amplificaron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> y se titularon mediante formación de placas de lisis en medio semi-sólido.

## **5. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA**

### **5.1. Extracción del RNA total intracelular**

Para verificar la secuencia, analizar la estabilidad de los virus generados, y cuantificar la expresión de mRNAs celulares, se extrajo el RNA total de las células infectadas utilizando el reactivo *RNeasy Mini kit* (QIAGEN), según el protocolo del fabricante. El RNA purificado se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando un *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, USA) y se almacenó a -80°C hasta su uso.

### **5.2. Generación de cDNAs mediante RT-PCR**

Para la generación de cDNAs a partir de los RNAs purificados, se llevó a cabo una reacción de transcripción reversa (RT) utilizando el reactivo *High Capacity cDNA RT kit* (Applied biosystems). La reacción se realizó en un volumen de 20 µl utilizando 100 ng de RNA como molde y hexanucleótidos al azar proporcionados en el *kit*. La reacción se mantuvo durante 10 min a 25°C y 120 min a 37°C. La enzima se inactivó incubando a 85°C durante 5 segundos. Los cDNAs generados se almacenaron a -20°C.

Para verificar la secuencia de las mutaciones introducidas en el genoma viral, se utilizaron 2 µl del cDNA generado en la reacción de RT como molde en una reacción de PCR utilizando la enzima *Vent Polimerase*, como se ha descrito previamente.



## **6. PURIFICACIÓN, MANIPULACIÓN Y EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS**

### **6.1. Obtención y purificación de proteína 3a del SARS-CoV y sus mutantes a partir de un baculovirus recombinante (rBV-3a)**

Células H5 al 80% de confluencia se infectaron a una multiplicidad de infección (mdi) de 1 con el rBV-3a y se incubaron a 22°C. Las células se recogieron a las 72 hdi y se resuspendieron en un primer tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, pH 7.5) suplementado con el inhibidor de proteasas *Protease Inhibitor Cocktail* al 1% (Sigma). Los extractos se centrifugaron a 12000xg durante 10 min a 4°C y los sedimentos se resuspendieron en un segundo tampón de lisis (8 M Urea, 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1% IGEPAL, 1mM β-mercaptoetanol, 10mM imidazol, pH 7.5). Las muestras se sonicaron tres veces consecutivas durante 20 segundos cada una y se centrifugaron a 12000xg durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, la proteína presente en el sobrenadante, se purificó por cromatografía de afinidad metálica (IMAC) usando una resina de cobalto (GE-Scientific) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Las distintas fracciones del proceso de purificación se analizaron en geles de poliacrilamida al 12% mediante azul de *Coomassie* utilizando el reactivo *EZBlue Gel Staining Reagent* (Sigma). Finalmente la proteína obtenida se pasó por una columna de exclusión molecular *PD-10 desalting column* (GE-Healthcare), a efectos de eliminar la urea y otros compuestos residuales del proceso de purificación, incompatibles con las posteriores inmunizaciones. La proteína se eluyó finalmente en PBS.

### **6.2. Generación de anticuerpos específicos para la proteína 3a del SARS-CoV**

Para obtener anticuerpos policlonales (Apcs) de conejo específicos para el extremo amino terminal y el extremo carboxilo terminal de la proteína 3a del SARS-CoV (Apc-3aNT y Apc-3aCT), se sintetizaron péptidos correspondiendo a regiones expuestas de la proteína que pudiesen implicar una alta inmunogenicidad. Para Apc-3aNT se generó un péptido con los aminoácidos 11-24 (C-ESITAQPVKIDNAS). Para el anticuerpo Apc-3aCT el péptido se correspondió con los aminoácidos 170-183 (C-VETGDGISTPKLKE). En ambos casos, se añadió un residuo de cisteína que permitió su conjugación a una molécula de poli-lisina con 8 brazos, para generar antígenos peptídicos múltiples. Se inmunizaron dos conejos por la empresa Biogenes (Berlin), siguiendo su protocolo estándar y se obtuvieron los correspondientes sueros inmunes, que se valoraron por inmunofluorescencia e inmunodetección (*Western blot*) utilizando células infectadas con el rSARS-CoV y células infectadas con el rSARS-CoV-Δ3a, como control negativo.

### 6.3. Inmunodetección de proteínas (*Western blot*)

Los extractos de proteínas de células infectadas se obtuvieron incubando con el tampón de lisis de proteínas que contenía 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL y el inhibidor de proteasas *Complete* (Roche), pH 8, durante 15 minutos a 4°C. Los extractos de proteínas se analizaron en geles desnaturalizantes de acrilamida-SDS de gradiente *NuPAGE® Novex 4-12% Bis/Tris Precast Gels* (Life technologies) utilizando el tampón de carga *NuPAGE® LDS* suplementado o no con 1 mM DTT. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante el sistema *Mini Protean II* (BioRad) utilizando un tampón de transferencia que contenía 25 mM Tris/HCl, 192 mM glicina, 20% metanol pH 8.3 durante 1 hora a 110 V. Las membranas se bloquearon durante 1 hora con leche al 5% en tampón TTBS (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) y se incubaron con los anticuerpos de la proteína 3a generados en conejo Apc-3a (dilución 1:500). Los anticuerpos unidos se detectaron con anticuerpos conjugados a la peroxidasa del rábano picante (HRP), específicos para las distintas especies (dilución 1:30000, Sigma), y el sustrato *Immobilon Western* (Millipore).

### 6.4. Inmunofluorescencia indirecta

A los tiempos indicados, se retiró el medio de cultivo de las células Vero E6 transfectadas o infectadas, y las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células dos veces con PBS y se permeabilizaron a temperatura ambiente con 0.1% Triton X-100 ó 0.2% Saponina en función del ensayo, durante 10 o 15 minutos, respectivamente. Las incubaciones con los anticuerpos primarios se realizaron en PBS suplementado con 10% FBS durante 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente. Se utilizaron los anticuerpos generados en ratón: SARS-CoV proteína E (dilución 1:500), ERGIC53 (dilución 1:200, Alexis Biochemicals), proteína disulfuro isomerasa (PDI; 1:500, Abcam), 58K (1:100, Abcam), aconitasa 2 (1:500, Abcam), rab5 (1:100, BD Biosciences), rab7 (1:100, BD Biosciences), lamp-1 (1:50, Santa Cruz Biotechnologies) y ATPasa de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (1:50, Santa Cruz Biotechnologies); o en conejo: SARS-CoV proteína Apc-3aNT (1:500). Para marcar las proteínas se utilizaron anticuerpos secundarios específicos frente a las distintas especies conjugados a los fluoróforos *Alexa 488* o *Alexa 546* (dilución 1:500, Life technologies). Los núcleos se tiñeron utilizando DAPI (1mg/ml, Sigma). Los cristales se montaron en portas utilizando el reactivo *ProLong Gold anti-fade reagent* (Life technologies) y se examinaron en un microscopio confocal *Leica SP5* (Leica Microsystems). Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa informático Image J (Schneider y col., 2012) y su plug-in JACoP (Bolte y Cordelieres, 2006). Se analizaron tres áreas imagen de 120 × 120 pixels en las que hubiese alta acumulación de proteína 3a y

se calculó el coeficiente de Pearson (Pc). Se consideró que no había colocalización cuando se obtuvo un Pc por debajo de 0.6. Para coeficientes de Pearson de entre 0.6 y 0.85 se consideró que había colocalización parcial y si, en cambio, el Pc era mayor que 0.85 se consideró que sí había colocalización.

## **7. MEDIDAS DE LA ACTIVIDAD CANAL IÓNICO**

### **7.1. Reconstitución de canales iónicos en membranas lipídicas artificiales**

Para reconstituir el canal iónico de la proteína 3a en membranas lipídicas artificiales y medir su actividad canal iónico, se formaron bicapas lipídicas con distintas composiciones de lípidos (Avanti polar lipids, Inc.). Las membranas se añadieron sobre orificios de 70-90  $\mu\text{m}$  de diámetro hechos en una membrana de teflón de 15  $\mu\text{m}$  de espesor que separaba dos cámaras. Las cámaras contenían soluciones de NaCl o KCl tamponadas con 5 mM HEPES, pH 6. Las medidas de actividad canal iónico se realizaron a temperatura ambiente. La inserción de los canales en las membranas se consiguió añadiendo de 0.5 a 1  $\mu\text{l}$  de una solución de 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  del péptido de interés en una mezcla de acetonitrilo:isopropanol (40:60) sobre una de las cámaras (cámara *cis*). Los distintos potenciales eléctricos se aplicaron utilizando electrodos de Ag/AgCl montados en 2 M KCl y aislados mediante puentes de agarosa al 2.5%. Los potenciales se definieron como positivos, cuando fueron más altos en la cámara donde se añadió el péptido (cámara *cis*), con respecto a la otra cámara (*trans*), utilizada como referencia. Para medir la intensidad de corriente y aplicar los distintos voltajes, se utilizó el equipo *Axopatch 200B amplifier* (Molecular Devices). Todo el sistema se aisló utilizando una doble pantalla metálica (Amuneal Manufacturing Corp.), para evitar interferencias eléctricas externas a las medidas. La conductancia de un solo canal iónico se obtuvo realizando mediciones de corriente bajo un potencial de +100 mV en soluciones de 1M KCl o NaCl con 5 mM HEPES pH 6. Los valores de conductancia registrados se evaluaron utilizando un ajuste Gaussiano con el programa *Sigma Plot 10.0* (Systat Software, Inc.). Para medir selectividad, se calcularon los potenciales de reversión ( $E_{\text{rev}}$ ) formando gradientes de concentración de electrolitos entre las cámaras. Después de la inserción de uno o varios canales en la membrana, se registró una corriente iónica. Dicha corriente se ajustó a cero jugando con el potencial aplicado. El potencial necesario para conseguir corriente cero es el  $E_{\text{rev}}$ . A partir de este parámetro, se obtuvieron los valores de permeabilidad del canal a las distintas especies iónicas del sistema utilizando la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (Hodgkin y Katz, 1949).

## **8. PATOGENESIS VIRAL EN RATÓN**

### **8.1. Cepa de ratón utilizada, inoculación y manejo de ratones infectados**

Todos los protocolos de trabajo fueron aprobados por el NIH-CDC de acuerdo a la legislación de EEUU (**Anexo I**), por el Comité de Ética del Centro de Investigación en Sanidad Animal CISA-INIA (números de permiso: 2011-009 y 2011-09) y por el Centro Nacional de Biotecnología de acuerdo con el Real Decreto Español (RD 53/2013), las normas internacionales de la Unión Europea 2010/63/UE y la ley española 32/2007 sobre la protección y el manejo de los animales de experimentación. Para los experimentos de patogénesis del SARS-CoV se utilizaron hembras de ratones libres de patógenos específicos BALB/c OlaHsd (Harlan) de 16 semanas de edad. Los ratones se anestesiaron con isoflurano y se inocularon intranasalmente utilizando 100000 ufp del virus correspondiente en un volumen de 50 µl de DMEM suplementado con 2% de FBS. La manipulación de ratones infectados se llevó a cabo en un laboratorio de nivel 3+ de bioseguridad del CISA-INIA equipado con la infraestructura de contención descrita anteriormente para el trabajo con cultivos celulares, y además, con un *rack* ventilado *Animal transport unit-Bio containment unit* (Harvard) para mantener a los animales durante el desarrollo del experimento.

### **8.2. Seguimiento de la enfermedad y análisis de la virulencia**

Después de inocular intranasalmente a los ratones con los virus, se monitorizó diariamente su peso, los síntomas de la enfermedad y la supervivencia de los mismos durante un periodo de 10 días. Los animales que durante el experimento alcanzaron pérdidas de peso superiores al 25% fueron sacrificados de acuerdo con los protocolos de eutanasia establecidos.

### **8.3. Producción viral en los pulmones de ratón**

Para analizar la producción de virus, se recogieron los pulmones de los ratones infectados a días 2 y 4 después de la inoculación. El pulmón derecho se homogenizó en 2 ml de PBS suplementado con 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 50 µg/ml de gentamicina y 0.25 µg/ml anfotericina B utilizando un homogeneizador *gentleMACS Dissociator* (Milteny Biotec) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Las muestras se centrifugaron a 3000xg durante 10 min a 4°C, y se recogieron los sobrenadantes para su titulación.

### **8.4. Extracción de RNA de pulmón**

Para obtener el RNA total de pulmón, las muestras se recogieron a días 2 y 4 después de la inoculación y se incubaron en el reactivo *RNAlater* (Ambion) a 4°C durante 48 horas con el

fin de preservar la integridad de las moléculas de RNA. Seguidamente las muestras se congelaron a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Para extraer el RNA total, los pulmones se homogeneizaron en 2 ml de tampón *RLT lysis buffer* (QIAGEN) suplementado con  $\beta$ -mercaptoetanol al 1% utilizando el sistema *gentleMACS Dissociator* (Miltenyi Biotec) siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. Las muestras se centrifugaron a 3000xg durante 10 minutos, y el RNA se purificó de los sobrenadantes utilizando el reactivo *RNeasy mini kit* (QIAGEN) como se ha descrito previamente.

## **9. ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO DE LEVADURA**

Se han realizado dos ensayos de doble híbrido de levadura con dos objetivos distintos.

### **9.1. Doble híbrido de levadura para estudiar la interacción del dominio carboxilo terminal de la proteína 3a de SARS-CoV**

Estos ensayos fueron realizados por Hybrigenics (Francia) usando como captura el dominio carboxilo terminal de la proteína 3a del SARS-CoV (aminoácidos 133 al 274). El captura se introdujo en el vector de expresión de doble híbrido de levadura pB27. Este plásmido se utilizó para transformar células de levadura L40ΔGAL4, que se aparearon con levaduras de la cepa Y187 (Fromont-Racine y col., 1997) previamente transformadas con una librería de cDNAs de pulmón humano con más de 10 millones de fragmentos independientes (ligando). Se analizaron un total de 299 millones de interacciones y se identificaron 258 clones positivos tras seleccionar con un medio sin leucina, triptófano e histidina. Se amplificaron los fragmentos de ligando mediante PCR y se secuenciaron. Las secuencias se filtraron, se dividieron en contigs y se compararon con la base de datos GenBank utilizando BLASTn (NCBI). Para evaluar la importancia de la interacción se asignó un índice de confianza a cada ligando identificada. Una interacción se considera de alta confianza cuando se han observado uniones positivas en al menos dos evaluaciones independientes, o cuando se han identificado interacciones en un mismo ensayo con varios fragmentos solapantes de la proteína “ligando”. Una interacción se considera de confianza moderada cuando en todas las evaluaciones realizadas la interacción se ha observado al menos una vez. Por el contrario, se considera una interacción de baja confianza si participa en ella una proteína “ligando” con motivos de interacción muy promiscuos y que, por tanto, interacciona con un alto número de proteínas celulares sin mostrar especificidad (Formstecher y col., 2005).

## **9.2. Doble híbrido de levadura para estudiar la interacción de los PBMs de SARS-CoV y MERS-CoV con el PDZoma humano**

Para realizar estos ensayos me trasladé temporalmente al laboratorio de Jean-Paul Borg y Pascale Zimmermann en el Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, en Marsella. Como captura se utilizaron péptidos compuestos por los últimos 15 aminoácidos de las proteínas E y 3a de SARS-CoV y de las proteínas E y 5 de MERS-CoV que incluían sus PBMs. Como control negativo, se utilizaron estos mismos péptidos sin los últimos tres aminoácidos ya que son clave para la actividad de los PBMs. Cada uno de estos capturas se introdujeron en el vector de expresión del doble híbrido de levadura pGBT9. Con este plásmido se transformaron levaduras de la cepa AH109 proporcionándoles la capacidad de crecer en un medio sin triptófano. Como ligando, se utilizó una librería compuesta por los 266 dominios PDZ humanos descritos o PDZoma humano (Belotti y col., 2013a). También se utilizaron 44 construcciones de los dominios PDZ que se encuentran en tándem dentro de la misma proteína a menos de 15 aminoácidos de distancia, dado que se ha sugerido que estos dos dominios PDZ situados tan próximos podrían funcionar como un único dominio (Luck y col., 2012). Cada uno de estos dominios se introdujo en el vector de expresión del doble híbrido de levadura pACT2 y se utilizaron para transformar levaduras de la cepa Y187 proporcionándoles la capacidad de crecer en un medio sin leucina. Estas levaduras se aparearon con levaduras AH109 transformadas previamente con los capturas. Las interacciones positivas entre los PBMs virales y PDZ celulares se identificaron seleccionando las levaduras en un medio sin leucina, triptófano e histidina tal y como se detalla en (Belotti y col., 2013b).

## **10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los resultados mostrados en esta memoria se expresaron como la media de los datos más la desviación estándar. Para analizar las diferencias entre los valores medios de los distintos grupos se utilizó el test de la *t* de *Student*. Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando el p-valor fue inferior a 0.1.

## **RESULTADOS**

## 1. RELEVANCIA DE LAS VIROPORINAS DEL SARS-CoV EN SU REPLICACIÓN Y PATOGENICIDAD

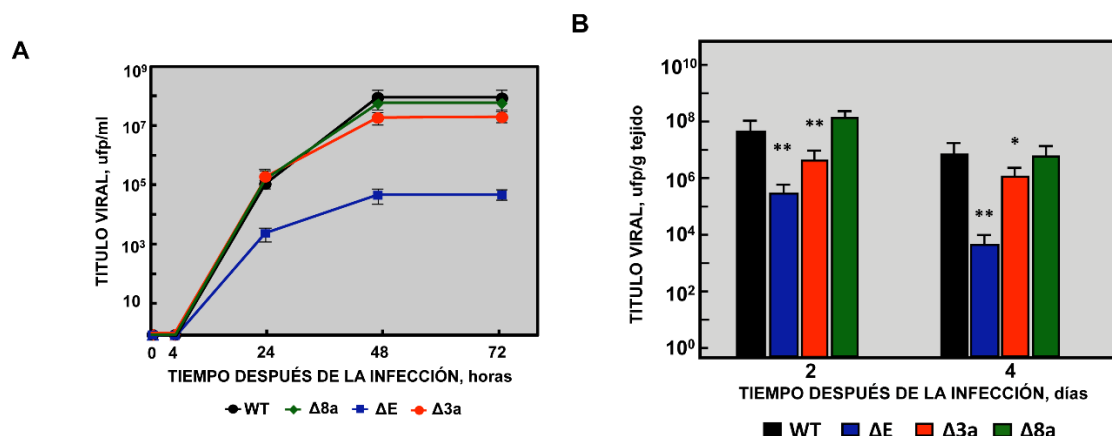
### 1.1 Rescate, caracterización y crecimiento de mutantes de delección del SARS-CoVs para cada una de sus viroporinas

Para analizar la relevancia de las viroporinas del SARS-CoV en replicación y patogénesis viral, se generaron tres virus recombinantes que tenían delecionadas cada una de estas viroporinas: rSARS-CoV- $\Delta E$  ( $\Delta E$ ), rSARS-CoV- $\Delta 3a$  ( $\Delta 3a$ ) y rSARS-CoV- $\Delta 8a$  ( $\Delta 8a$ ). Se partió de un virus con el genoma de SARS-CoV adaptado a crecer en ratón (MA15), dado que se ha demostrado que la infección de ratones convencionales con el virus SARS-CoV-MA15 reproduce fielmente los síntomas de la enfermedad humana (Fett y col., 2013; Roberts y col., 2007). Los virus mutantes se rescataron eficientemente, se clonaron tres veces y se confirmó que su secuencia era la esperada (datos no mostrados).

Para analizar la relevancia de las proteínas E, 3a y 8a, en la producción de virus, se estudiaron las cinéticas de crecimiento de los mutantes de delección en células Vero E6 de mono (**Figura 7A**). Los mutantes  $\Delta E$  y  $\Delta 3a$  alcanzaron un título viral inferior al virus parental que en el caso del mutante  $\Delta E$  fue 100 veces menor al virus wt (cerca de  $8 \times 10^5$  pfu/mL) mientras que los del  $\Delta 3a$  tan sólo decrecieron ligeramente ( $3 \times 10^7$  pfu/mL). Estos resultados sugieren que las proteínas E y 3a son necesarias para una replicación óptima del virus en cultivos celulares. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en la producción viral entre el virus parental y el mutante  $\Delta 8a$  ( $9 \times 10^7$  pfu/ml).

La contribución de cada una de estas viroporinas a la producción viral también se analizó *in vivo*. Para ello, se inocularon intranasalmente ratones BALB/c con el virus parental o con cada uno de los mutantes de delección. A los 2 y 4 días después de la infección se extrajeron los pulmones de los ratones infectados, se homogeneizaron y se determinó el título viral (**Figura 7B**). En todos los casos, los títulos más altos se detectaron 2 días después de la infección y disminuyeron entre 5 y 40 veces 4 días después de la misma. El virus nativo y el mutante  $\Delta 8a$  mostraron los títulos más altos, en torno a  $1 \times 10^8$  ufp/g y  $2 \times 10^7$  ufp/g 2 y 4 días después de la infección, respectivamente. Sin embargo, los títulos de los mutantes de delección  $\Delta E$  y  $\Delta 3a$  fueron de dos y una unidad logarítmica respectivamente, menores que el virus parental.





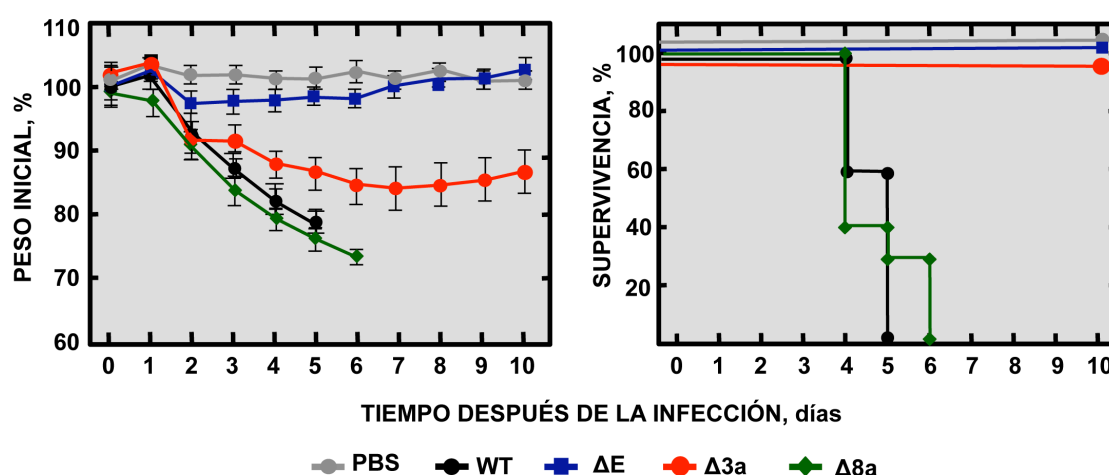
**Figura 7. Cinéticas de crecimiento de mutantes de delección de las viopporinas SARS-CoV. (A)** Se infectaron células Vero E6 subconfluentes con los SARS-CoV silvestre (wt) (círculos negros) y con los mutantes de delección generados mediante ingeniería genética ΔE (cuadrados azules), Δ3a (círculos rojos) and Δ8a (rombos verdes), a una mdi de 0.001. Se recogieron los sobrenadantes a 4, 24, 48 y 72 horas después de la infección y se titularon por el método de formación de placas de lisis. Las barras de error representan la desviación estándar de los títulos obtenidos al repetir el experimento tres veces. **(B)** Se infectaron grupos de seis ratones BALB/c de 16 semanas con 100000 ufp del virus parental (wt, columnas negras), o los mutantes de delección generados por ingeniería genética carentes de proteína E (ΔE, columnas azules), proteína 3a (Δ3a, columnas rojas) o proteína 8a (Δ8a, columnas verdes). A los días 2 y 4 después de la infección se sacrificaron tres ratones de cada grupo para calcular el título viral en pulmón. Las barras de error representan la desviación estándar de los títulos obtenidos en los pulmones de los 3 ratones utilizados por cada condición experimental. Los datos estadísticamente significativos están representados con asteriscos según el p-valor obtenido en el análisis de la t de Student: \*, P valor < 0.1; \*\*, P valor < 0.01; \*\*\*, P valor < 0.001.

Curiosamente, la disminución en títulos virales que mostró el mutante Δ3a fue más significativa *in vivo* que en cultivos celulares. Estos resultados confirman la relevancia de las proteínas E y 3a en la replicación viral *in vivo*.

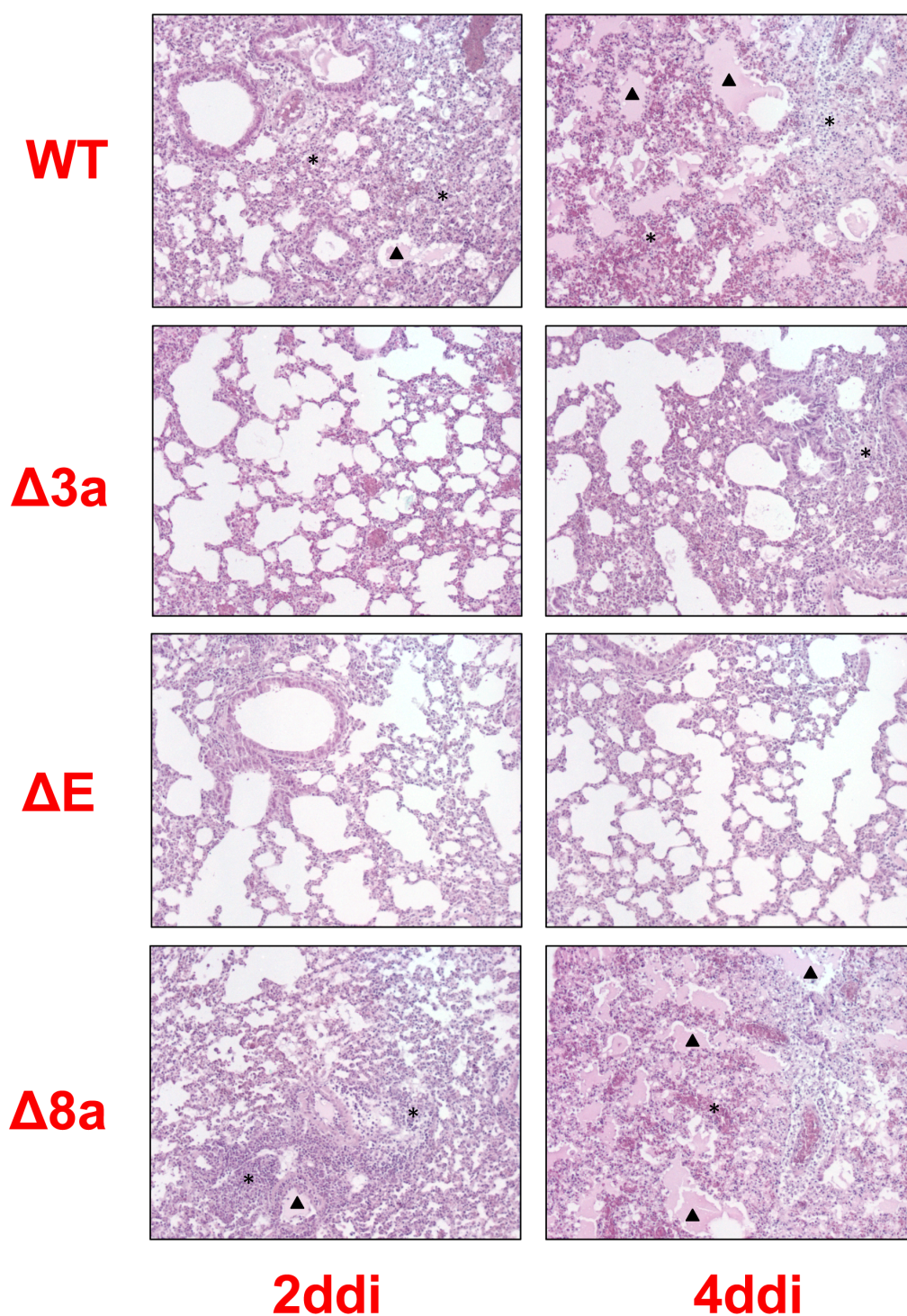
## 1.2 Relevancia de las viopporinas del SARS-CoV en patogénesis en el modelo de ratón Balb/c

Para analizar la contribución de las viopporinas 3a, E y 8a a la virulencia del SARS-CoV, se inoculaban intranasalmente ratones BALB/c con el virus parental o con cada uno de los mutantes de delección de estas proteínas. A continuación, los animales se monitorizaron diariamente durante 10 días (**Figura 8**). Los ratones infectados con los mutantes que carecían de las proteínas E o 3a se recuperaron de la infección con un 100% de supervivencia. Sin embargo, los ratones infectados con el virus parental y el mutante Δ8a mostraron síntomas de enfermedad, tales como una movilidad reducida, la presencia de pelo erizado

(datos no mostrados) o la pérdida de peso dos días después de la inoculación. Además, los ratones infectados con el virus parental y el mutante  $\Delta 8a$  murieron a causa de la infección entre los días 4 y 6, indicando que las proteínas E y 3a son un factor determinante del fenotipo virulento. Para estudiar con más detalle la patología inducida por estos virus, se obtuvieron microsecciones de pulmón de ratones infectados con el virus parental o con los mutantes de delección a días 2 y 4 después de la inoculación. Las muestras se tiñeron mediante hematoxilina y eosina y se analizaron los cambios histopatológicos. En los animales infectados con los virus letales (parental y  $\Delta 8a$ ), se detectó un engrosamiento de los epitelios alveolares, presencia de infiltraciones leucocitarias en las zonas infectadas y acumulación de edema a los dos tiempos evaluados (**Figura 9**). Por otro lado, los animales infectados con los virus atenuados ( $\Delta E$  y  $\Delta 3a$ ), presentaron las vías aéreas despejadas y tan sólo se observó una presencia limitada de infiltrados leucocitarios en el caso del los ratones infectados por el mutante  $\Delta 3a$ .



**Figura 8. Patogénesis inducida por mutantes de delección de las viroporinas de SARS-CoV.** Se inocularon grupos de cinco ratones de 16 semanas de edad con 100000 ufp del virus parental (WT, círculos negros), o de los mutantes de delección generados mediante ingeniería genética:  $\Delta E$  (cuadrados azules),  $\Delta 3a$  (círculos rojos),  $\Delta 8a$  (rombos verdes) o sin virus (PBS, círculos grises). Se determinaron las pérdidas de peso medias (gráfica de la izquierda) y la supervivencia (gráfica de la derecha) durante 10 días. Las barras de error representan la desviación estándar del peso de los ratones en cada condición experimental.



**Figura 9. Histopatología inducida por los mutantes de delección de las viroporinas del SARS-CoV.** Se inocularon grupos de seis ratones de 16 semanas de edad con 100000 ufp del virus parental (WT) y los mutantes de delección  $\Delta E$ ,  $\Delta 3a$  y  $\Delta 8a$ . A los 2 y 4 días después de la infección (ddi) se sacrificaron 3 ratones de cada grupo y se recogieron sus pulmones. Los pulmones se fijaron con formalina de zinc, incluyeron en parafina, cortaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los

triángulos y los asteriscos indican acumulación de edema e infiltración de leucocitos respectivamente. El aumento original utilizado fue de 20x.

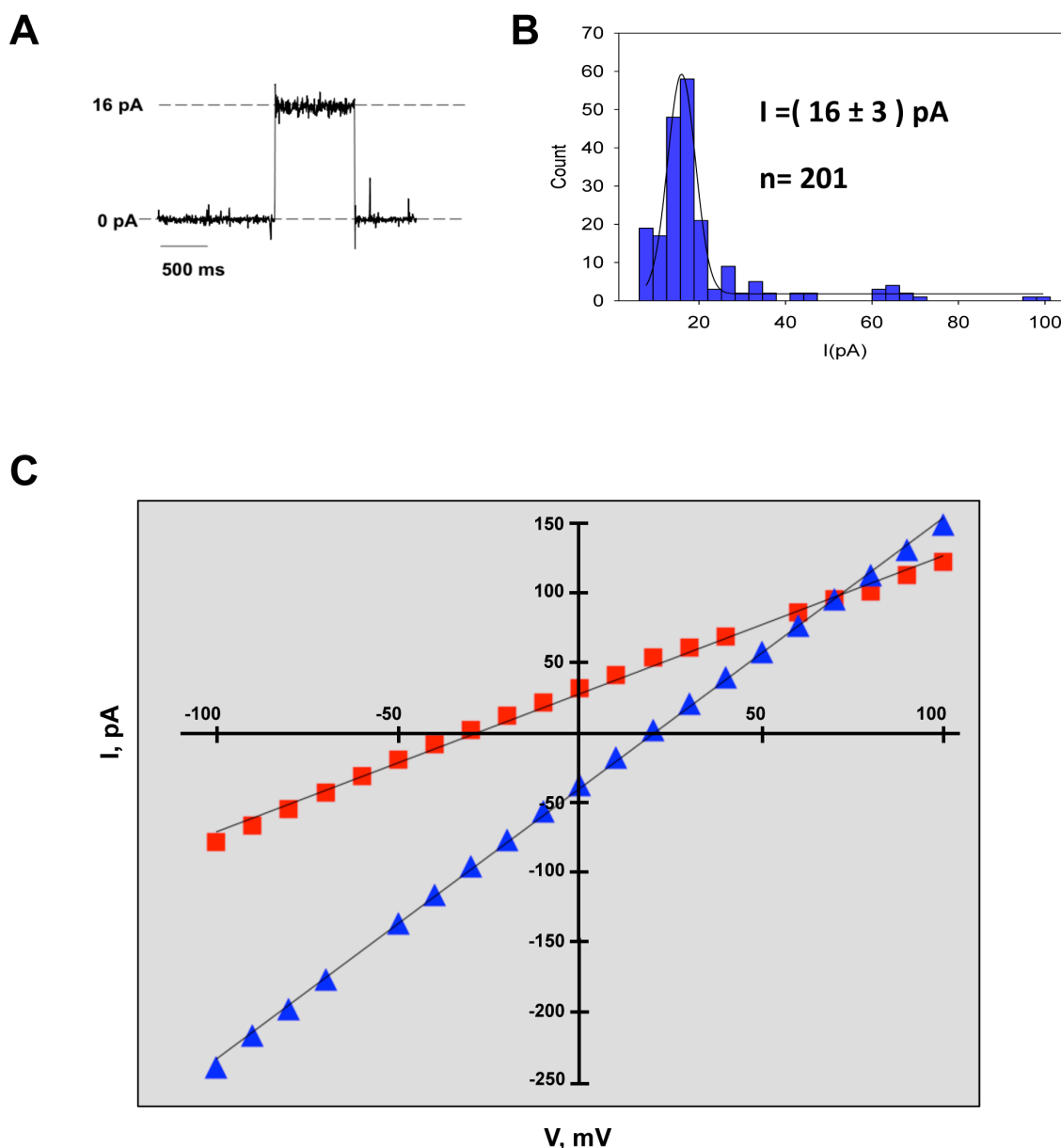
## 2. ACTIVIDAD CANAL IÓNICO DE LA PROTEÍNA 3a DEL SARS-CoV

### 2.1 Conductancia, regulación por voltaje y selectividad de la proteína E del SARS-CoV en membranas lipídicas artificiales

La actividad CI de la proteína E del SARS-CoV juega un papel en la replicación y patogenicidad viral (Nieto-Torres y col., 2014). Sin embargo, la relevancia de la actividad CI de la proteína 3a no se había estudiado. Por ello se caracterizó la actividad CI de la proteína 3a en bicapas lipídicas artificiales. Se utilizó este sistema porque es lo suficientemente sensible para captar la corriente eléctrica de un solo canal iónico (Bezrukov y Vodyanoy, 1993). Se generó un baculovirus que expresaba la proteína 3a fusionada a diez residuos de histidina en su extremo carboxilo terminal. La proteína se produjo en células de insecto Sf9 y se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina con base de cobalto (GE-Biosciences). La conductancia de la proteína 3a purificada se evaluó en la presencia de KCl en bicapas lipídicas artificiales compuestas de una mezcla de lípidos biológicamente relevante de DOPC:DOPS:DOPE (dioleoil fosfatidilcolina/dioleoil fosfatidilserina/dioleoil fosfatidiletanolamina) en proporción 3:1:1 (w/w), y se observó el salto de intensidad más abundante, cercano a 16 pA (**Figura 10A**). También se observaron saltos de intensidad formados por el ensamblamiento simultáneo de dos o tres canales iónicos, aunque con mucha menor frecuencia (**Figura 10B**). Para estudiar si el CI de la proteína 3a del SARS-CoV se comporta como un CI regulado por voltaje, se midió su actividad en bicapas lipídicas artificiales a distintas diferencias de potencial en presencia de cationes monovalentes (NaCl) o divalentes ( $\text{CaCl}_2$ ) (**Figura 10C**). En todos los casos se observó una relación lineal entre intensidad y voltaje y el canal mostró propiedades de transporte simétricas cuando se aplicaron diferencias de potencial positivas o negativas. Estos resultados indicaron que el CI de la proteína 3a del SARS-CoV no se abre o cierra según la diferencia de potencial aplicada, sino que conduce los iones de forma proporcional a la diferencia de potencial. Por tanto, es un canal que está abierto independientemente del voltaje aplicado.

El potencial de reversión ( $E_{\text{rev}}$ ) de un ión se define como el voltaje aplicado necesario para que la corriente eléctrica total sea 0 cuando hay un gradiente de concentración de dicho ión a ambos lados de la membrana. El  $E_{\text{rev}}$  sirve para cuantificar la selectividad iónica del canal. El signo positivo o negativo del  $E_{\text{rev}}$  proporciona una estimación de la selectividad del canal informando de su preferencia por cationes o aniones. (Aguilella y col., 2011; Hille, 2001). Mediante una comparación entre el  $E_{\text{rev}}$  medido y el  $E_{\text{rev}}$  teórico que se obtendría en un poro neutro, es decir, debido tan sólo a las movibilidades intrínsecas de cationes y aniones,

es posible deducir la selectividad del canal iónico. El  $E_{rev}$  teórico se calcula utilizando la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) (Hodgkin y Katz, 1949) reemplazando la relación de permeabilidades  $P_+/P_-$  por la del coeficiente de difusión  $D_+/D_-$  (Hodgkin y Katz, 1949).



**Figura 10. Caracterización de la actividad canal iónico de la proteína 3a del SARS-CoV. (A)** Registro de la actividad de un solo canal iónico de la proteína 3a. **(B)** Histograma de intensidades de los saltos de corriente detectados para la proteína 3a a +100mV en 500mM KCl compuesto por valores de 201 eventos registrados. **(C)** La proteína 3a mostró relaciones voltaje (V)/intensidad (I) lineales tanto en soluciones de 500/50 mM NaCl (cuadrados rojos) como de 500/50 mM CaCl<sub>2</sub> (triángulos azules). Cada punto de las gráficas I-V representa la media de al menos tres experimentos. Las barras de error, que determinaban las desviaciones estándar, fueron inferiores al tamaño de los símbolos. Los valores experimentales se ajustaron a una línea definida mediante regresión lineal.



Un  $E_{rev}$  experimental mayor que el teórico implica una preferencia por aniones. Si el  $E_{rev}$  medido es menor que el teórico la preferencia es por cationes. En cambio, si el  $E_{rev}$  medido es igual al teórico indica que el canal no tiene preferencia por la carga del ión. En el caso del Cl de la proteína 3a se observó una baja preferencia por cationes en presencia de iones monovalentes (sodio y potasio). Sin embargo, en presencia  $Ca^{2+}$  la proteína 3a se comportó como un canal neutro sin ninguna preferencia por cationes o aniones (**Tabla IV**). En conjunto, estos resultados mostraron que el canal iónico de la proteína 3a conduce al menos iones de  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{++}$ .

**Tabla IV. Potencial de reversion ( $E_{rev}$ ) de la proteína 3a en experimentos en soluciones de 500/50mM**

Iones	$E_{rev}$ experimental (mV)	$E_{rev}$ teórico* (mV)
NaCl	$-19.1 \pm 14.8$	+8.86
KCl	$-13.0 \pm 4.0$	+0.73
$CaCl_2$	$+18.8 \pm 6.0$	+20.3

Los valores de  $E_{rev}$  mostrados son la media de al menos 7 experimentos independientes.

\*Valor teórico para un poro neutro.

## 2.2 Identificación de aminoácidos esenciales para la actividad CI de la proteína 3a

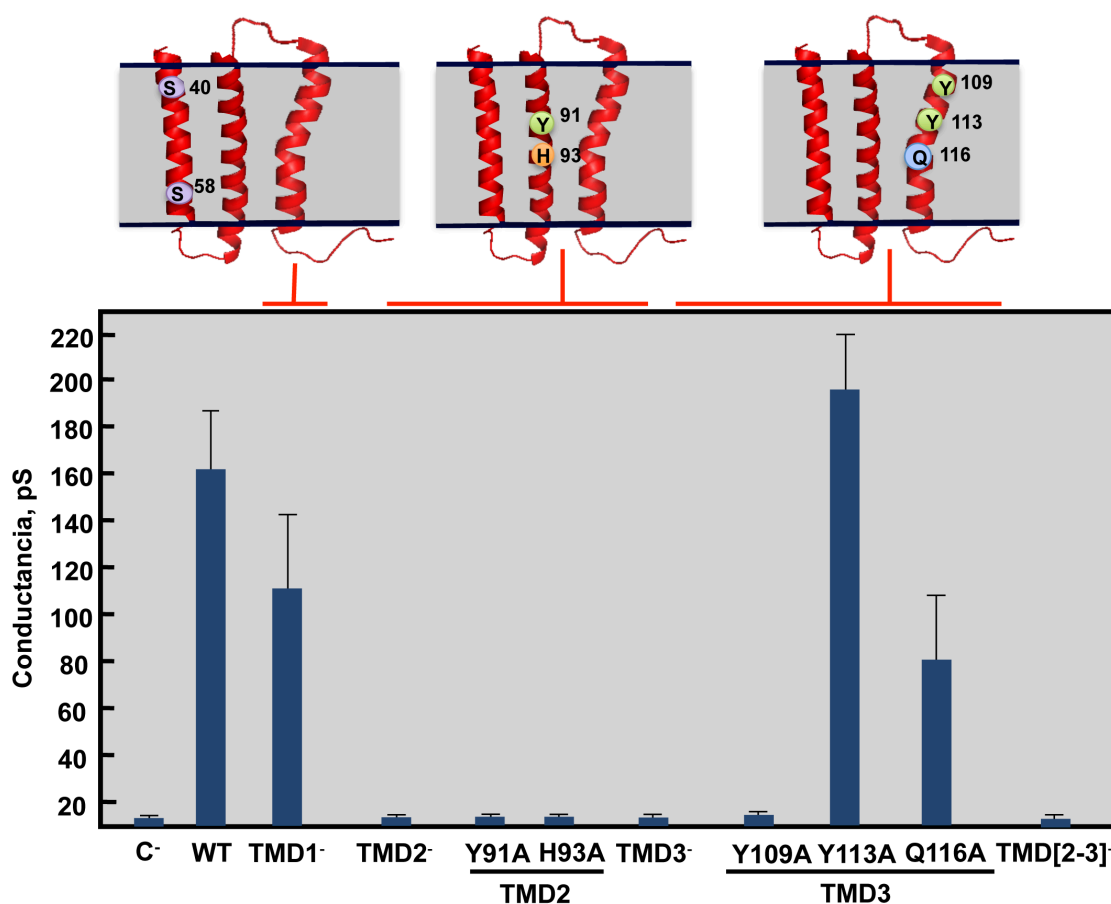
Para poder eliminar la actividad CI de la proteína 3a del SARS-CoV fue necesario identificar primero los aminoácidos implicados en dicha actividad. Para ello, se generó un conjunto de baculovirus recombinantes que expresaban los mutantes de la proteína 3a. Se sustituyeron los aminoácidos que estaban orientados hacia el lumen del poro, según los modelos estructurales propuestos, dado que el cambio de los mismos podía afectar a la actividad CI con un mínimo impacto en su estructura tridimensional. Para seleccionar los aminoácidos potencialmente orientados hacia el lumen del poro se utilizaron modelos *in silico* dado que no se ha descrito experimentalmente la estructura de la proteína 3a (Hsu y Fischer, 2012; Kruger y Fischer, 2009). Como esta proteína tiene tres dominios transmembranas (DTMs) se generaron baculovirus que introducían sustituciones a alanina que afectaban a varios residuos de cada DTM, tentativamente expuestos al lumen del poro. Estos mutantes afectaban a uno (DTM1<sup>-</sup>, DTM2<sup>-</sup>, DTM3<sup>-</sup>), o dos DTMs (DTM[2,3]<sup>-</sup>) (**Tabla V**).

El mutante DTM[2,3]<sup>-</sup> se construyó porque según los modelos *in silico*, era probable que la actividad canal iónico residiese en los DTM 2 y 3 (Hsu y Fischer, 2012; Kruger y Fischer, 2009). Las proteínas 3a mutantes se produjeron en células de insecto, se purificaron y su actividad canal iónico se evaluó en membranas lipídicas artificiales (**Figura 11**). El mutante

DTM1<sup>-</sup> mostró actividad CI al contrario que los mutantes DTM2<sup>-</sup>, DTM3<sup>-</sup> y DTM[2,3]<sup>-</sup>, confirmando la importancia de los DTMs 2 y 3 prevista por los modelos *in silico* (Hsu y Fischer, 2012; Kruger y Fischer, 2009).

**Tabla V. Mutaciones en el canal iónico de la proteína 3a del SARS-CoV**

Mutante	Mutaciones
DTM1 <sup>-</sup>	S40A, S58A
DTM2 <sup>-</sup>	Y91A, H93A
DTM3 <sup>-</sup>	Y109A, Y113A, Q116A
DTM[2,3] <sup>-</sup>	Y91A, H93A, Y109A, Y113A, Q116A



**Figura 11. Efecto de las mutaciones en el canal iónico de la proteína 3a del SARS-CoV.** Se analizó la actividad canal iónico de mutantes recombinantes de la proteína 3a en membranas lipídicas artificiales. Las gráficas representan valores medios de conductancia. El control negativo (C<sup>-</sup>) indica los valores de conductancia obtenidos en ausencia de proteínas. Las barras de error muestran las variaciones obtenidas en 100 medidas independientes.

Para identificar aminoácidos específicos de estos DTMs que contribuyen a la actividad CI de la proteína 3a, se generó un nuevo conjunto de baculovirus de la proteína 3a. En este caso, se introdujeron mutaciones puntuales que afectaban a un solo aminoácido que ya había sido mutado en los mutantes dobles y triples de la proteína 3a: DTM2<sup>-</sup> (Y91A, H93A) y DTM3<sup>-</sup> (Y109A, Y113A, Q116A). Estos nuevos mutantes se produjeron y purificaron y su actividad CI se evaluó en membranas artificiales. Los mutantes puntuales Y91A y H93A del DTM2 y el mutante Y109A del DTM3 no mostraron actividad CI mientras que los mutantes Y113A y Q116A mostraron conductividades similares o moderadamente menores que la proteína wt, respectivamente. Estos resultados indicaron que los residuos Y91 y H93 del DTM2 y el Y109 del DTM3 contribuyen de forma crítica a la actividad CI de la proteína 3a del SARS-CoV. Por tanto, se identificaron tres aminoácidos que al ser mutados eliminarían la actividad CI de esta proteína.

### **3. RELEVANCIA DE LA ACTIVIDAD CI DE LA PROTEÍNA 3a DEL SARS-CoV EN LA REPLICACIÓN Y PATOGENICIDAD VIRAL**

#### **3.1 Rescate, caracterización y crecimiento de mutantes defectivos en la actividad IC de la proteína 3a**

Para analizar la relevancia de la actividad CI de la proteína 3a del SARS-CoV en replicación y virulencia se generó una colección de virus recombinantes con mutaciones en este gen que inhibían o no la actividad CI de la proteína 3a: rSARS-CoV-MA15-3a-TMD1<sup>-</sup>, -TMD2<sup>-</sup>, -TMD3<sup>-</sup>, -TMD[2,3]<sup>-</sup>, -Y91A, -H93A, -Y109A, -Y113A and -Q116A. En este caso, también se utilizó un SARS-CoV adaptado al crecimiento en ratón (MA15). Los virus mutantes se rescataron eficientemente, se clonaron y se confirmó su secuencia (datos no mostrados). Primero, se analizó el crecimiento viral en células VeroE6 infectadas con cada uno de los mutantes. Todos los mutantes alcanzaron títulos similares al del virus parental ( $5 \times 10^7$  ufp/ml) (**Figura 12A**) indicando que la replicación viral en cultivos celulares era independiente de la actividad canal iónico de la proteína 3a.

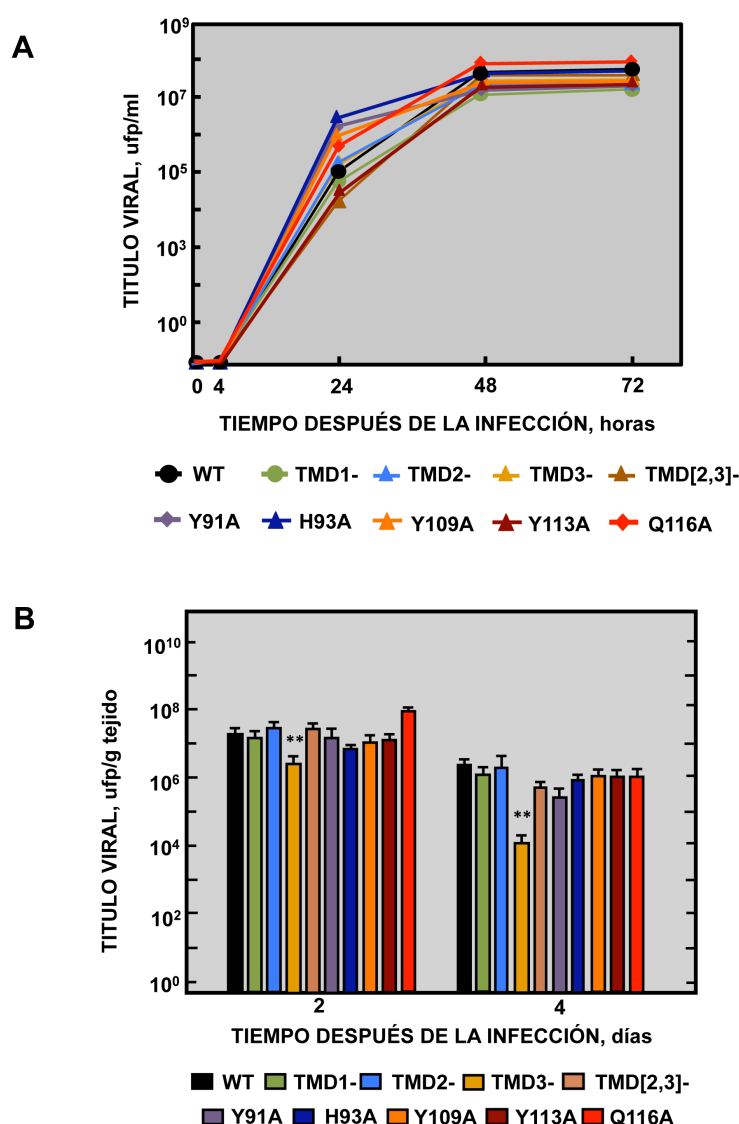
También se estudió el crecimiento viral en ratones BALB/c examinando los títulos virales de los pulmones a 2 y 4 días post-infección. Todos los mutantes mostraron títulos virales similares a los del virus nativo (cerca de  $1 \times 10^7$  ufp/g de tejido pulmonar a día 2, y  $4 \times 10^6$  ufp/g a día 4) a excepción del mutante DTM3<sup>-</sup>, que redujo su título 10 veces en comparación con el resto virus ( $3 \times 10^6$  ufp/g a día 2, y  $1 \times 10^4$  ufp/g a día 4) (**Figura 12B**). Estos resultados



sugieren que la actividad CI de la proteína 3a del SARS-CoV no se requiere para la replicación viral en pulmones de ratón.

### 3.2 Influencia de la actividad CI de la proteína 3a del SARS-CoV en la patogénesis que causa en ratones BALB/c

Se estudió el requerimiento de la actividad CI de la proteína 3a del SARS-CoV en dos experimentos independientes. En el primero, ratones BALB/c fueron inoculados con el virus parental rSARS-CoV-MA15 como control virulento, rSARS-CoV-MA15-Δ3a como control atenuado y los mutantes rSARS-CoV 3a-DTM (Figura 12A).

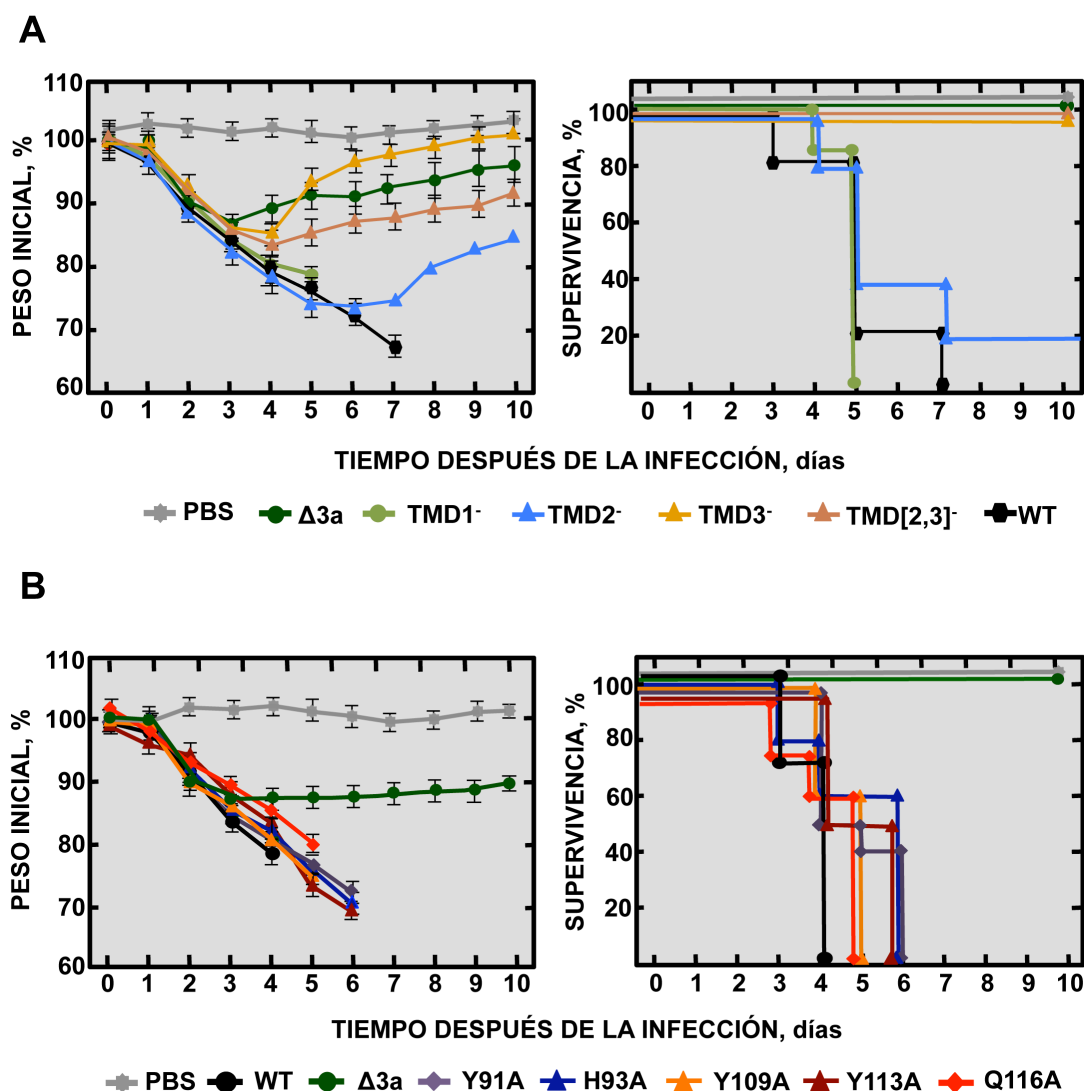


**Figura 12. Cinéticas de crecimiento de mutantes enfocados en la actividad canal iónico de la proteína 3a. (A)** Se infectaron células Vero E6 subconfluentes con los SARS-CoV silvestre (wt) (●) y con los mutantes de la proteína 3a generados mediante ingeniería genética afectando a los dominios transmembrana TMD1 (TMD1; círculos verde claro), TMD2 (TMD2; triángulos azul claro), TMD3

(TMD3<sup>-</sup>, triángulos ocre), TMD 2 y 3 a la vez (TMD[2,3]<sup>-</sup>, triángulos marrón claro), o a los residuos Y91 (Y91A, rombo púrpura), H93 (H93A, triángulo azul oscuro), Y109 (Y109A, triángulo naranja), Y113 (Y113A, triángulo marrón oscuro) or Q116 (Q116A, rombo rojo), a una mdi de 0.001. Se recogieron los sobrenadantes a 4, 24, 48 y 72 horas después de la infección y se titularon por el método de formación de placas de lisis. La desviación estándar no se ha representado para una mejor claridad de la gráfica pero fue en todos los casos menor al 5%. El experimento fue repetido tres veces. **(B)** Se infectaron grupos de seis ratones BALB/c de 16 semanas con 100000 ufp del virus parental (wt, columnas negras), o los mutantes TMD1<sup>-</sup> (columnas verde claro), TMD2<sup>-</sup> (columnas azul claro), TMD3<sup>-</sup> (columnas ocre), TMD[2,3]<sup>-</sup> (columnas marrón claro), Y91A (columnas púrpura), H93A (columnas azul oscuro), Y109A (columnas naranjas), Y113A (columnas marrón oscuro) and Q116A (columnas rojas). A los días 2 y 4 después de la infección, tres ratones de cada grupo fueron sacrificados para calcular el título viral en sus pulmones. Las barras de error representan la desviación estándar de los títulos obtenidos en los pulmones de los 3 ratones utilizados por cada condición experimental. Los datos estadísticamente significativos están representados con asteriscos según el p-valor obtenido en el análisis de la t de Student: \*, P valor < 0.1; \*\*, P valor < 0.01; \*\*\*, P valor < 0.001.

Los signos clínicos y la supervivencia se examinaron durante los 10 días posteriores a la infección. Todos los ratones infectados con el virus parental mostraron claros signos clínicos desde el día 2 p.i, caracterizados por pérdida de peso, pelo erizado y disminución del movimiento. Todos los ratones murieron antes de los 7 días después de la infección. Los ratones infectados con el mutante DTM2<sup>-</sup> mostraron signos de enfermedad y solo el 20% sobrevivió. Por el contrario, los ratones infectados con los mutantes DTM3<sup>-</sup> o DTM[2,3]<sup>-</sup> se recuperaron completamente de la infección con una tasa de supervivencia del 100%, de forma similar a como lo hicieron los ratones infectados por el control atenuado rSARS-CoV-MA15-Δ3a (**Figura 13A**).

En el segundo experimento, los ratones se infectaron con rSARS-CoV-MA15, rSARS-CoV-MA15-Δ3a y con los mutantes del SARS-CoV con mutaciones puntuales en la proteína 3a (Y91A, H93A, Y109A, Y113A, Q116A). La infección de los ratones con estos mutantes causó síntomas severos de la enfermedad y a los 6 días después de la infección todos los ratones habían muerto. Se observó una situación similar con los ratones infectados por el virus silvestre contrastando con la observada al infectarlos con el virus atenuado rSARS-CoV-MA15-Δ3a, en la que todos sobrevivieron (**Figura 13B**). Cada vez que un ratón falleció en ambos experimentos, se extrajeron sus pulmones, se aislaron los virus que contenían y se secuenció el gen de la 3a. En ningún caso se observaron mutaciones compensatorias que pudiesen restaurar la actividad IC de la proteína 3a, lo que confirmó que esta actividad no estaba directamente relacionada con la virulencia del SARS-CoV.



**Figura 13. Patogénesis inducida por mutantes que afectan a la actividad canal iónico de la proteína 3a.** Se inocularon grupos de cinco ratones de 16 semanas de edad sin virus (PBS, círculos grises) o con 100000 ufp del virus parental (WT, círculos negros), o de los mutantes de generados mediante genética reversa:  $\Delta 3a$  (círculos verdes), y **(A)** mutantes con alteraciones en los DTM de la proteína 3a (TMD1<sup>-</sup>, círculos verde claro), TMD2 (TMD2<sup>-</sup>, triángulos azules claros) TMD3 (TMD3<sup>-</sup>, triángulos ocre) o TMD2 y 3 a la vez (TMD[2,3]<sup>-</sup>, triángulos marrón claro). **(B)** mutantes puntuales de la proteína 3a Y91A (rombos púrpura), H93A (triángulos azul oscuro), Y109A (triángulos naranja), Y113A (triángulos marrón oscuro) o Q116A (rombos rojos). Se determinaron las pérdidas de peso medias (gráfica de la izquierda) y la supervivencia (gráfica de la derecha) durante 10 días. Las barras de error representan la desviación estándar del peso de los ratones en cada variable experimental.

#### 4. RELEVANCIA DEL MOTIVO DE UNIÓN A DOMINIOS PDZ DE LA PROTEÍNA 3a DEL SARS-CoV EN LA PRODUCCIÓN Y LA EVOLUCIÓN VIRAL

##### 4.1 Rescate, caracterización y crecimiento de mutantes del SARS-CoV sin motivos de unión a dominios PDZ en la proteína 3a

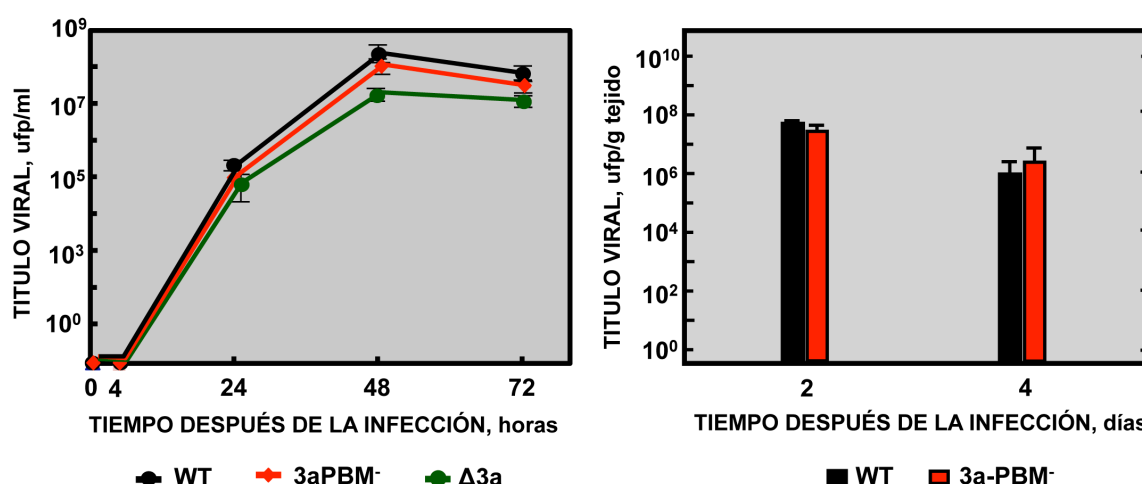
El PBM de la proteína E del SARS-CoV es un factor de virulencia que al unirse a la proteína celular Sintenina causa la activación de la MAPK p38, lo que causa la sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias que causan la muerte del hospedador (Jimenez-Guardeño y col., 2014). Sin embargo, la relevancia del PBM de la proteína 3a en replicación y virulencia todavía no se ha estudiado. Para determinar su actividad, se generó un virus sin el PBM de la proteína 3a (3aPBM<sup>-</sup>). Dado que la secuencia de nucleótidos del gen 3a solapa parcialmente con la del gen 3b, los cuatro aminoácidos finales de la proteína, que forman la secuencia principal del PBM (SVPL) fueron sustituidos introduciendo mutaciones silenciosas para el gen de la proteína 3b. Los nucleótidos que codificaban estos aminoácidos se seleccionaron cuidadosamente de forma que la proteína 3b mantuviese su secuencia de aminoácidos intacta y el PBM de la proteína 3a quedase eliminado (GMSM). Para introducir estas mutaciones se utilizó la secuencia del SARS-CoV adaptado al crecimiento en ratón (MA15).

Los virus mutantes se rescataron eficientemente, se clonaron y se confirmó que su secuencia era la esperada (datos no mostrados). Primero, se estudió el crecimiento viral en células VeroE6 infectadas con el mutante observando que alcanzaba títulos virales similares al virus silvestre ( $5 \times 10^7$  ufp/ml) (**Figura 14**). A continuación, se estudió el crecimiento del virus en ratones BALB/c examinando los títulos del mismo en los pulmones a 2 y 4 días después de la infección observándose para el virus mutante títulos similares a los del virus nativo (cerca de  $5 \times 10^7$  ufp/g de tejido pulmonar a día 2, y  $4 \times 10^6$  ufp/g a día 4) (**Figura 14**). Ello indicó que la replicación del SARS-CoV en cultivos celulares y también en el pulmón del ratón, era independiente de la presencia de un motivo PBM en la proteína 3a.

##### 4.2 Influencia del PBM de la proteína 3a del SARS-CoV en su patogenicidad en ratones BALB/c

Para estudiar la relevancia del PBM de la proteína 3a en la virulencia del SARS-CoV, ratones BALB/c se inoculaban intranasalmente con el virus parental rSARS-CoV-MA15 como control virulento, rSARS-CoV-MA15-Δ3a como control atenuado y el mutante rSARS-CoV-3aPBM<sup>-</sup> (**Figura 15**). Al examinar los síntomas clínicos y la supervivencia de los ratones se observó que todos ellos mostraron síntomas de infección a partir del día 2 después de la infección. Tanto los ratones inoculados con el virus parental como los infectados con el mutante rSARS-CoV-3aPBM<sup>-</sup> fallecieron 8 días después de la infección, con signos severos de la enfermedad.

Por el contrario, la totalidad de los ratones infectados con el control atenuado rSARS-CoV-MA15- $\Delta$ 3a sobrevivieron. No se encontraron mutaciones compensatorias al secuenciar el virus 3aPBM<sup>-</sup> aislado de pulmones de ratones infectados, indicando que el motivo PBM de la proteína 3a del SARS-CoV no estaba implicado en virulencia, en contraste con el motivo PBM de la proteína E.

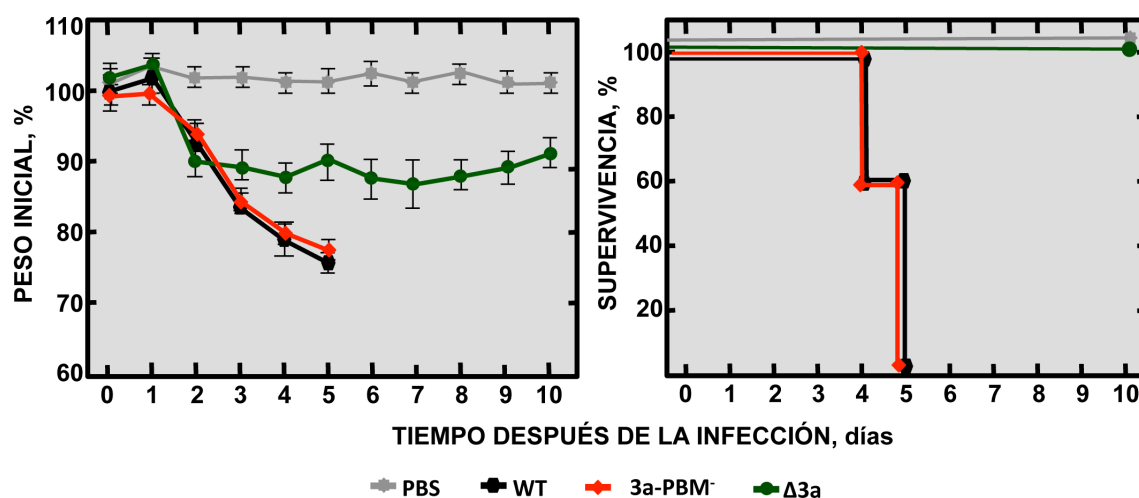


**Figura 14. Cinéticas de crecimiento del mutante desprovisto del PBM de la proteína 3a del SARS-CoV. (A)** Se infectaron células Vero E6 subconfluentes con los SARS-CoV silvestre (wt) (círculos negros) y con los mutantes generados mediante ingeniería genética  $\Delta$ 3a (círculos verdes) y 3a-PBM<sup>-</sup> (rombos rojos) a una mdi de 0.001. Se recogieron los sobrenadantes a 4, 24, 48 y 72 horas después de la infección y se titularon por el método de formación de placas de lisis. Las barras de error representan la desviación estándar de los títulos obtenidos al repetir el experimento tres veces. **(B)** Se infectaron grupos de seis ratones BALB/c de 16 semanas con 100000 ufp del virus parental (wt, columnas negras), o el mutante 3a-PBM<sup>-</sup> (columnas rojas). A los días 2 y 4 después de la infección, se sacrificaron tres ratones de cada grupo y se determinó el título viral en sus pulmones. Las barras de error representan la desviación estándar de los títulos obtenidos en pulmones en cada variable.

## 5. REQUERIMIENTO SIMULTÁNEO DE LAS VIROPORINAS DEL SARS-CoV

Para estudiar la interdependencia entre las vioporinas del SARS-CoV, se generó un conjunto de mutantes de delección combinando delecciones de una, dos o tres vioporinas (**Tabla VI**). Todos los virus se rescataron eficientemente a excepción de los virus que carecían simultáneamente de las proteínas E y 3a (rSARS-CoV-MA15- $\Delta$ [3a, E] y el triple mutante rSARS-CoV-MA15- $\Delta$ [3a, E, 8a]). El virus  $\Delta$ E y los dobles mutantes de delección  $\Delta$ [3a,8a] y  $\Delta$ [E,8a] mostraron títulos significativamente menores ( $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  y  $6 \times 10^5$  ufp/ml, respectivamente) a los infectados con virus nativo,  $\Delta$ 3a y  $\Delta$ 8a. Asimismo, cualquiera de los virus viables carentes de las proteínas E o 3a mostraron un tamaño de placa

significativamente menor al resto. Estos resultados mostraron que al menos una de las proteínas E o 3a tienen que estar presentes para que el virus sea viable, indicando que existe una redundancia entre ambas proteínas.



**Figura 15. Patogénesis inducida por el mutante sin el PBM de la proteína 3a del SARS-CoV.** Grupos de cinco ratones de 16 semanas de edad se inocularon con 100000 ufp del virus parental (WT, círculos negros), o con los mutantes generados mediante genética reversa:  $\Delta 3a$  (círculos verdes) y 3a-PBM<sup>-</sup> (rombos rojos). Como control, un grupo de ratones se inoculó con PBS (círculos grises). Se determinó la pérdida de peso media en cada grupo (gráfica de la izquierda) y la supervivencia (gráfica de la derecha) durante 10 días. Las barras de error representan la desviación estándar del peso de los ratones en cada condición experimental.

### 5.1 Localización subcelular de la proteína 3a del SARS-CoV

Para entender la naturaleza de la complementación entre las proteínas E y 3a, se consideró conveniente estudiar primero la localización subcelular de ambas proteínas. La proteína E del SARS-CoV se acumula en el compartimento intermedio entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (ERGIC) (Nieto-Torres y col., 2011). Sin embargo, la localización subcelular de la proteína 3a en el contexto de la infección tan sólo se ha estudiado de forma limitada (Lu y col., 2006). La colocalización potencial de las proteínas E y 3a se estudió infectando células Vero E6 con SARS-CoV nativo. Las células infectadas se fijaron 24h después de la infección, se permeabilizaron y la localización subcelular de las proteínas E y 3a se determinó por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos para cada una de las proteínas.

Tabla VI. Requerimiento simultáneo de las viroporinas del SARS-CoV

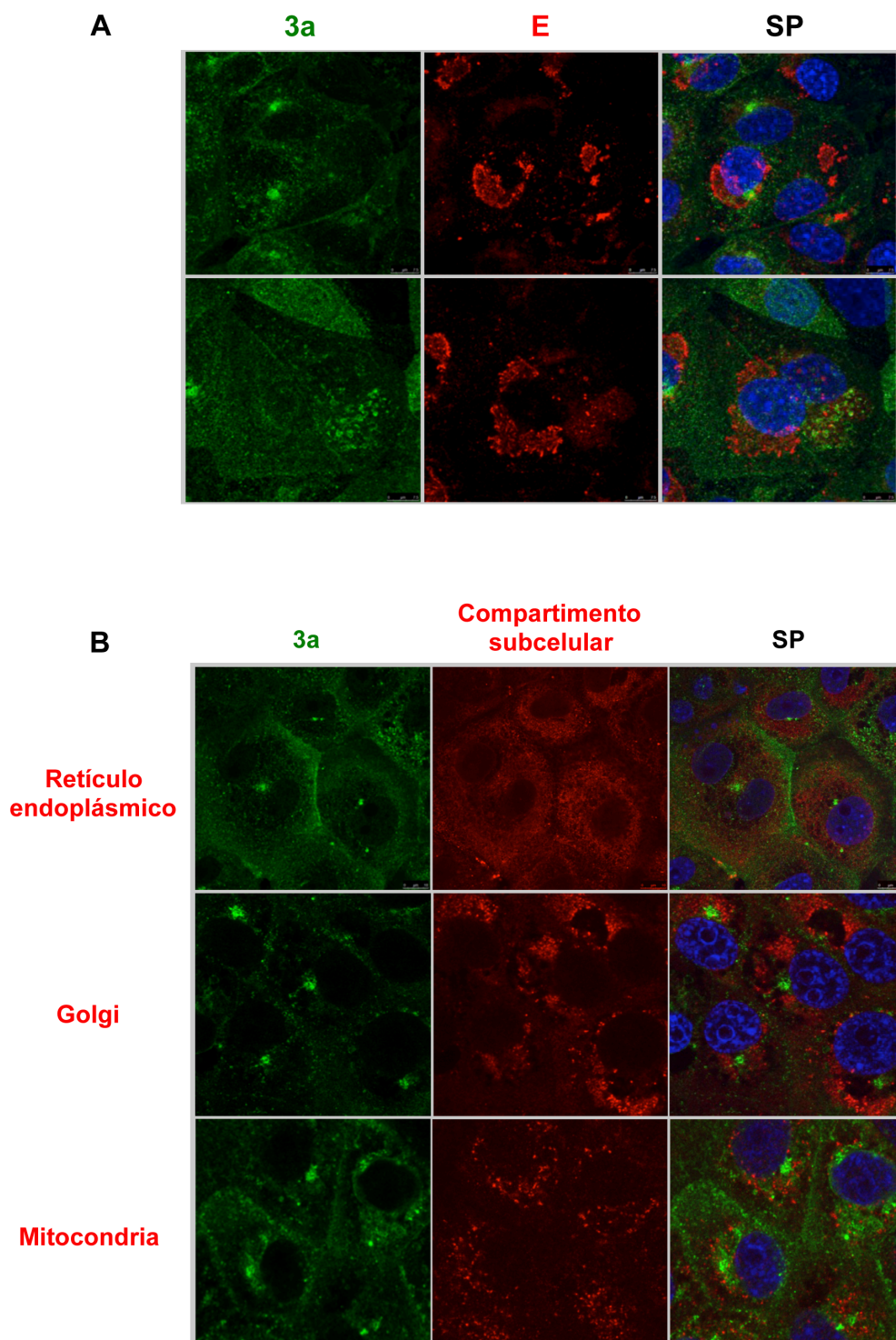
Viroporinas del SARS-CoV			Título viral (ufp/ml)
3a	E	8a	
+	+	+	$(4.0 \pm 1.2) \times 10^7$
+	+	-	$(5.0 \pm 2.1) \times 10^7$
-	+	+	$(1.0 \pm 1.9) \times 10^7$
+	-	+	$(1.0 \pm 0.8) \times 10^6$
+	-	-	$(6.6 \pm 1.4) \times 10^5$
-	+	-	$(2.4 \pm 1.1) \times 10^6$
-	-	+	$< 2.0 \times 10^{1*}$
-	-	-	$< 2.0 \times 10^{1*}$

\*Por debajo del límite de detección.

El análisis por microscopía confocal mostró que ambas proteínas estaban localizadas en diferentes compartimentos durante la infección dado que el coeficiente de Pearson fue preferentemente menor de 0.6 (**Tabla VII**) (Bolte y Cordelieres, 2006). La proteína 3a principalmente se acumuló en un compartimento sin identificar cercano al núcleo y distinto al ERGIC (**Figura 16**).

La actividad CI de la proteína E promueve la virulencia al liberar calcio del ERGIC, provocando la activación del inflammasoma (Nieto-Torres y col., 2014; Nieto-Torres y col., 2015a). Sin embargo, en esta tesis se ha demostrado que la actividad CI de la proteína 3a no influye en la virulencia del SARS-CoV. Para explicar las diferencias entre las proteínas E y 3a en su contribución a la virulencia del virus, se estudió la presencia de la proteína 3a en los principales reservorios celulares de calcio: el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y la mitocondria (Berridge y col., 2000).

Para estudiar si la proteína 3a se acumula en alguno de estos compartimentos, se realizó un análisis por microscopía confocal utilizando anticuerpos específicos para la proteína 3a del SARS-CoV y para proteínas celulares localizadas en los principales reservorios de calcio incluyendo la proteína PDI (retículo endoplasmático), 58K (aparato de Golgi) y aconitasa 2 (mitocondria) (**Figura 16B**). También se analizó la posible localización de la proteína 3a en otros compartimentos utilizando anticuerpos específicos para la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa (membrana plasmática), rab5 (endosomas tempranos), rab7 (endosomas tardíos) y LAMP-1 (lisosomas) (**Figura 17**).



**Figura 16. Análisis de la localización de la proteína 3a con la proteína E y en reservorios subcelulares de calcio mediante inmunofluorescencia.** Se inocularon células Vero E6 con SARS-CoV con una mdi de 0.3. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% a las 24 horas después de la infección. Se realizaron dobles marcajes utilizando anticuerpos específicos para la proteína 3a (verde) junto con anticuerpos para (A) la proteína E (rojo) o (B) específicos para PDI (retículo endoplasmático), 58K (Golgi) o aconitasa 2 (mitocondria) (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). SP indica la superposición de los canales verde, rojo y azul.



**Tabla VII. Análisis de la colocalización mediante el Coeficiente de Pearson**

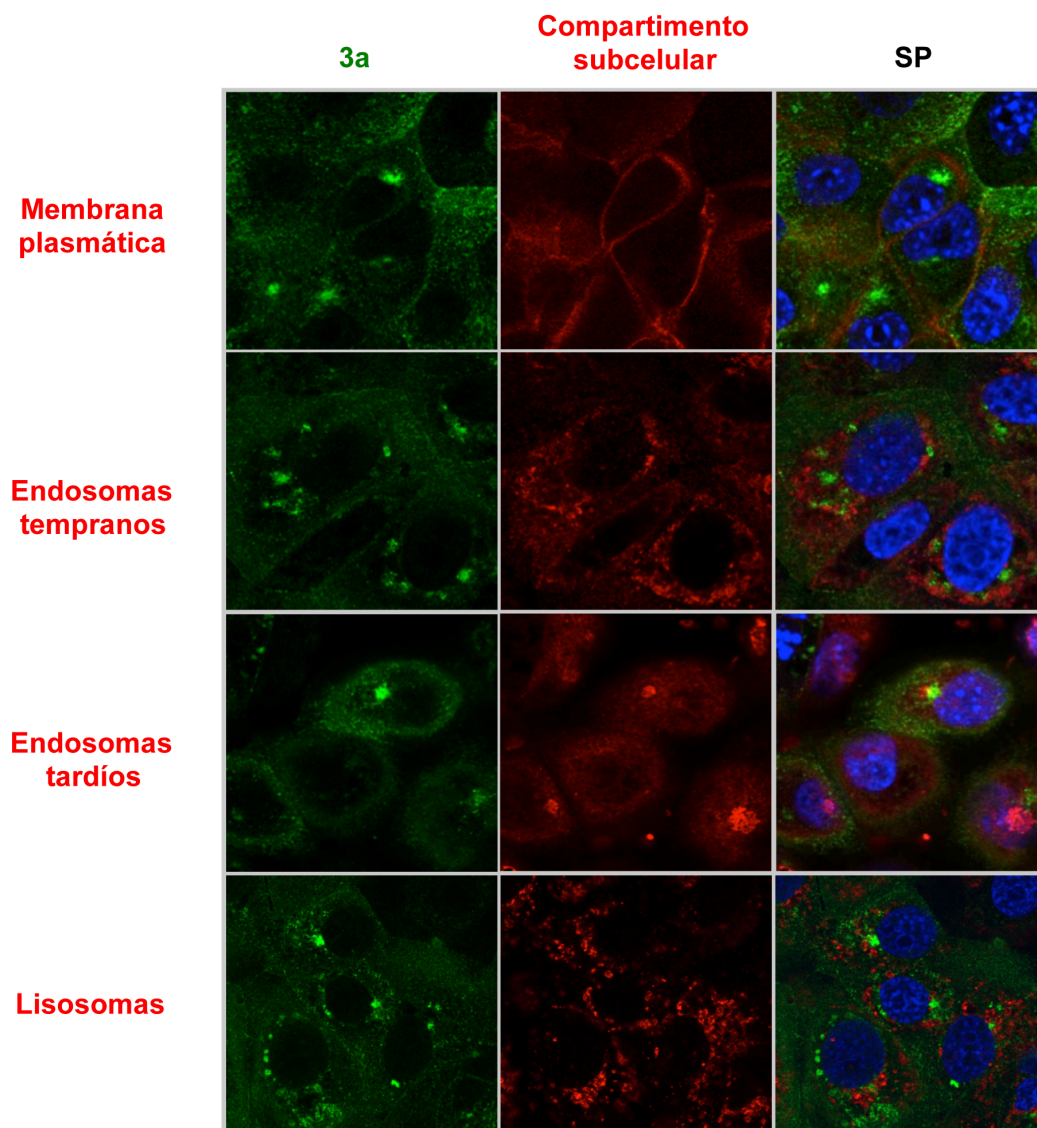
Colocalización entre	Coeficiente de Pearson
Proteína 3a & proteína E	0.24
Proteína 3a & retículo endoplásmico	0.16
Proteína 3a & Golgi	0.17
Proteína 3a & mitocondria	-0.01
Proteína 3a & membrana plasmática	0.04
Proteína 3a & endosomas tempranos	0.07
Proteína 3a & endosomas tardíos	0.47
Proteína 3a & lisosomas	-0.02

En todos los casos el coeficiente de Pearson fue menor a 0.6 (**Tabla VII**). La proteína 3a no se encontró en ninguno de los principales reservorios de calcio sugiriendo que la actividad canal iónico de la proteína 3a no está implicada en virulencia porque al no estar en ninguno de estos compartimentos, no aumentaría los niveles de calcio en el citosol como hace la proteína E.

## **5.2 Identificación de motivos potencialmente responsables de la complementación entre las proteínas E y 3a**

La identificación del dominio responsable de la complementación entre las proteínas E y 3a contribuirá a un mejor conocimiento de cómo actúan ambas viroporinas. Tanto la proteína E como la 3a comparten dos dominios funcionales: el canal iónico, localizado en sus DTMs, y el PBM en su dominio carboxilo terminal (Jimenez-Guardeño y col., 2014; Nieto-Torres y col., 2014). Para estudiar qué dominio es responsable de esta complementación, se generó un conjunto de mutantes con la proteína 3a delecionada, con proteínas E que contenían distintas sustituciones o deleciones a lo largo de su secuencia (**Figura 18**). Estas mutaciones consistían en: (i) Sustituciones por alanina en el dominio amino-terminal (rSARS-CoV-MA15- $[\Delta 3a, E\Delta 1]$ ), (ii) sustitución por alanina en el DTM suprimiendo la actividad IC ( $[\Delta 3a, EN15A]$ ) (Nieto-Torres y col., 2014), (iii) pequeñas deleciones a lo largo del dominio carboxilo terminal ( $[\Delta 3a, E\Delta 2]$ ,  $[\Delta 3a, E\Delta 3]$ ,  $[\Delta 3a, E\Delta 4]$ ,  $[\Delta 3a, E\Delta 5]$  and  $[\Delta 3a, E\Delta 6]$ ), (iv) introducción de un codón de parada localizado nueve aminoácidos antes del PBM, que eliminaba tanto los aminoácidos principales del PBM como los residuos colindantes ( $[\Delta 3a, E\Delta PBM]$ ), (v)

sustitución de los aminoácidos principales del PBM suprimiéndolo ([ $\Delta 3a, EPBM^-$ ]), (vi) o introduciendo un PBM alternativo con una capacidad de unión a dominios PDZ demostrada (Jimenez-Guardeño y col., 2014) ([ $\Delta 3a, EPBM^*$ ]). La viabilidad de estos virus se analizó mediante el rescate de los respectivos clones infectivos. Para cada mutante, se rescataron dos clones infectivos BAC generados independientemente (**Figura 18**).



**Figura 17. Localización subcelular de la proteína 3a mediante inmunofluorescencia.** Se inocularon células Vero E6 con SARS-CoV a una mdi de 0.3. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% a las 24 horas después de la infección. Se realizaron dobles marcajes utilizando anticuerpos específicos para la proteína 3a (verde) junto con anticuerpos para la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa (membrana plasmática), rab5 (endosomas tempranos), rab7 (endosomas tardíos) y lamp-1 (lisosomas) (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). SP indica la superposición de los canales verde, rojo y azul.

Las mutaciones que afectaron al dominio amino-terminal o a la actividad CI de la proteína E no influyeron en la viabilidad viral, indicando que ninguno de estos dominios poseía el

motivo responsable de la complementariedad entre las viroporinas 3a y E. Sin embargo, cuando el PBM de la proteína E se suprimió al sustituir sus aminoácidos principales, el virus no se rescató. Estos resultados se vieron reforzados cuando se sustituyó la mutación que suprimía el PBM por un PBM activo alternativo que restauró la viabilidad del virus. Es más, cuando se delecionó el PBM de la proteína E mediante la adición de un codón de parada, el virus reversionó rápidamente al pasarse en cultivos celulares, recobrando el motivo PBM ([Δ3a,E-ΔPBM(rev)]). Estos resultados sugieren firmemente el requerimiento del PBM para la viabilidad del SARS-CoV e indican que una proteína E con un PBM funcional compensa la pérdida de toda la proteína 3a. Los títulos de los virus viables se determinaron después de haberse pasado una vez, mostrando títulos marcadamente menores para los virus (Δ3a,EΔ1) y ([Δ3a,E-ΔPBM(rev)] en comparación con el virus Δ3a (**Figura 18**).

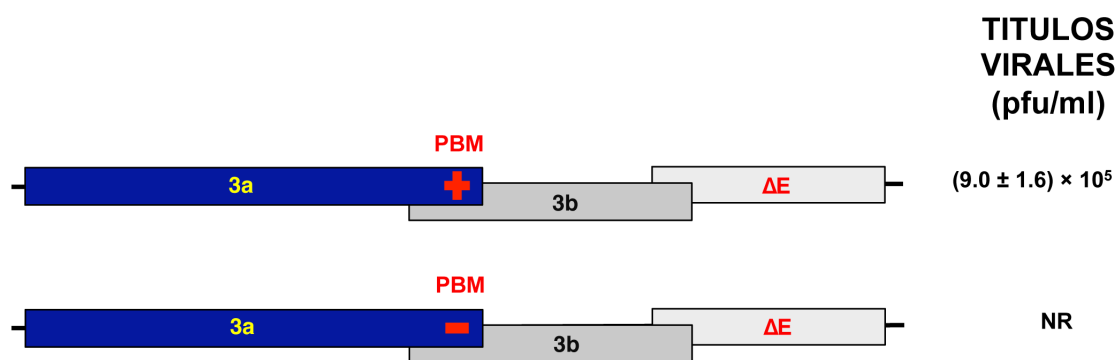
PROTEÍNA E		TÍTULOS VIRALES (ufp/ml)
N-TERMINAL	DTM	
C-TERMINAL		
wt	MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLCAYCCNIVNVLVKPTVYVYSRVKNLNSSEGVPDLLV	$(6.8 \pm 0.2) \times 10^5$
ΔE		NR
Δ1	MYAFVLSSEAGALIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLCAYCCNIVNVLVKPTVYVYSRVKNLNSSEGVPDLLV	$(6.0 \pm 1.1) \times 10^3$
CI <sup>-</sup> N15A	MYSFVSEETGTLIVASVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLCAYCCNIVNVLVKPTVYVYSRVKNLNSSEGVPDLLV	$(7.4 \pm 0.3) \times 10^5$
Δ2	MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTAL-----IVNVLVKPTVYVYSRVKNLNSSEGVPDLLV	NR
Δ3	MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLCAYCCN-----KPTVYVYSRVKNLNSSEGVPDLLV	NR
Δ4	MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLCAYCCNIVN-----VYVYSRVKNLNSSEGVPDLLV	NR
Δ5	MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLCAYCCNIVNVL-----LNSSEGVPDLLV	NR
Δ6	MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLCAYCCNIVNVLVKPTVYVYSRVKN-----	NR
ΔPBM	MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLCAYCCNIVNVLVKPTVYVYSRVKNLNS-----	NR
ΔPBM (rev)	MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLCAYCCNIVNVLVKPTVYVYSRVKNLNS-CGVPDLLV	$(3.0 \pm 2.5) \times 10^4$
PBM <sup>-</sup>	MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLCAYCCNIVNVLVKPTVYVYSRVKNLNSSEGVPGGGG	NR
PBM <sup>*</sup>	MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLCAYCCNIVNVLVKPTVYVYSRVKNLNSAGAPALAV	$(6.4 \pm 1.0) \times 10^5$

**Figura 18. Localización del dominio de la proteína E que ejerce la complementariedad con la proteína 3a.** La viabilidad de un conjunto de mutantes del SARS-CoV en un fondo Δ3a e incluyendo modificaciones a lo largo del gen E fue evaluada en células Vero E6. Los cambios en la proteína E incluían: Sustituciones a alanina en el dominio N-terminal (rSARS-CoV-MA15-[Δ3a,EΔ1]); mutación puntual en el DTM, suprimiendo la actividad canal iónico ([Δ3a,E-N15A]); pequeñas delecciones a lo largo del dominio Carboxilo terminal ([Δ3a,EΔ2], [Δ3a,EΔ3], [Δ3a,EΔ4], [Δ3a,EΔ5] and [Δ3a,EΔ6]); modificaciones en el PBM ([Δ3a,EΔPBM], [Δ3a,E-PBM<sup>-</sup>], [Δ3a,E-PBM<sup>\*</sup>]). ΔPBM(rev) es la secuencia del virus revertiente obtenido tras crecer el mutante ΔPBM en cultivos celulares. A la derecha se muestran

los títulos de los virus viables tras un primer pase y los no rescatados (NR). Los datos mostrados son la media y desviación estándar resultado de tres experimentos.

A continuación, se estudió si el PBM de la proteína 3a era indispensable para la viabilidad viral cuando faltase la proteína E. Para ello se generó un mutante en el que se suprimió el PBM de la proteína 3a eliminando al mismo tiempo la proteína E completa ([3a-PBM<sup>-</sup>,ΔE]). Este mutante resultó no ser viable (**Figura 19**), reforzando la necesidad de al menos un PBM funcional para la viabilidad de un virus carente del gen 3a o E. Estos resultados indican que las proteínas 3a y E con un PBM funcional se complementan la una a la otra y que esta complementación es crítica cuando falta una de las dos proteínas.

Para analizar la relevancia del acortamiento de la proteína, se construyó un nuevo mutante en el que la proteína 3a se hubiese delecionado y en el que los aminoácidos no conservados que fueron delecionados en el mutante EΔ4 se sustituyeron por alanina, con el fin de modificar estos dominios manteniendo la longitud original de la proteína [Δ3a,EΔ4\*] (**Figura 20**). El mutante fue viable, indicando que no había una especificidad de secuencia necesaria para la funcionalidad observada. Aparentemente, la viabilidad del virus requiere únicamente la longitud original del dominio carboxilo terminal. Sin embargo, no se puede descartar completamente un posible papel de otros dominios presentes en el extremo carboxilo terminal de la proteína E.



**Figura 19. Relevancia del PBM de la proteína 3a en la complementación con la proteína E.**

La viabilidad de los mutantes del SARS-CoV desprovistos de la proteína E (ΔE) y manteniendo o suprimiendo el PBM de la proteína 3a fue evaluada en células Vero E6. A la derecha se muestran los títulos de los virus viables tras un primer pase y los no rescatados (NR). Los datos mostrados son la media y desviación estándar resultado de tres experimentos.

PROTEÍNA E			VIRUS RESCATADO
N-TERMINAL	DTM	C-TERMINAL	
wt	MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLCAYCCNIVNVS	LVKPTVYVYSRVKLNLSSEGVPDLLV	SI
Δ4	MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLCAYCCNIVNV	-----VYVYSRVKLNLSSEGVPDLLV	NO
Δ4*	MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLCAYCCNIVNV	ALVAPAVYVYSRVKLNLSSEGVPDLLV	SI

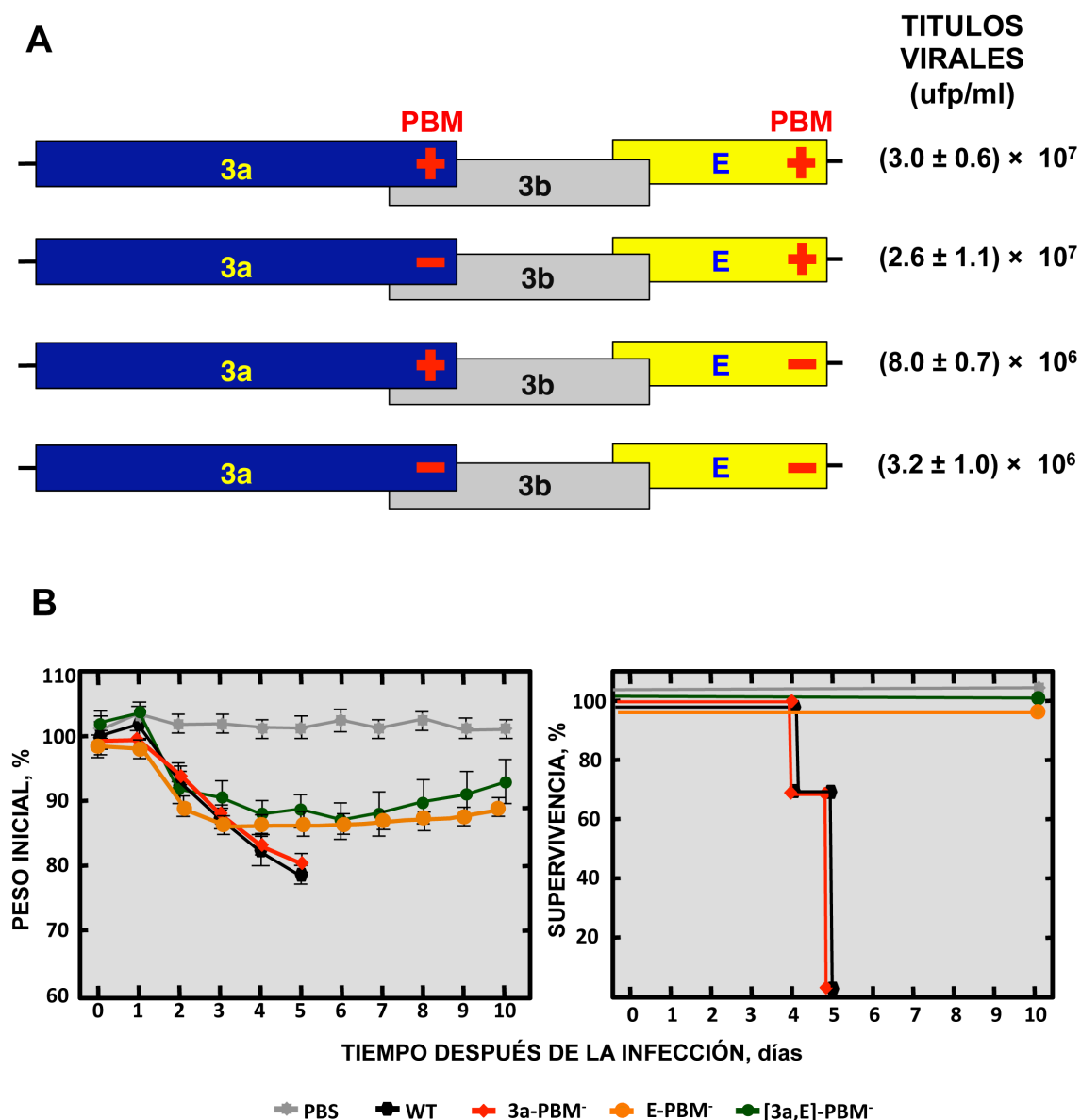
**Figura 20. Relevancia de la longitud del dominio carboxilo terminal de la proteína E para la complementación con la proteína 3a.** La viabilidad de un mutante del SARS-CoV en un fondo Δ3a e incluyendo una modificación del gen E rellenando la deleción del mutante EΔ4 fue evaluada en células Vero E6.

Para profundizar en el estudio del papel de los motivos PBM de las proteínas E y 3a en la viabilidad viral, se generó una nueva colección de mutantes en la que, en contraste que en las figuras 17 y 18, las proteínas E y 3a estaban presentes pero se eliminó uno ([3a-PBM<sup>-</sup>], [E-PBM<sup>-</sup>]) o los dos ([3a,E]-PBM<sup>-</sup>) PBMs virales. Los tres mutantes fueron viables. Sin embargo, los títulos virales disminuyeron 10 veces cuando se suprimieron los dos PBMs al mismo tiempo en comparación con el virus parental o con cada uno de los mutantes sin uno de los dos PBMs (**Figura 21A**). Además, cuando el PBM de la proteína E se mantenía intacto, el virus era altamente virulento independientemente de la presencia del PBM de la 3a (**Figura 21B**). En contraste, la mortalidad de los ratones infectados disminuyó significativamente cuando se suprimió el PBM de la proteína E, sin importar la presencia o ausencia del PBM de la proteína 3a. Estos resultados indicaron que existe una jerarquía entre las proteínas E y 3a y la naturaleza de sus PBMs.

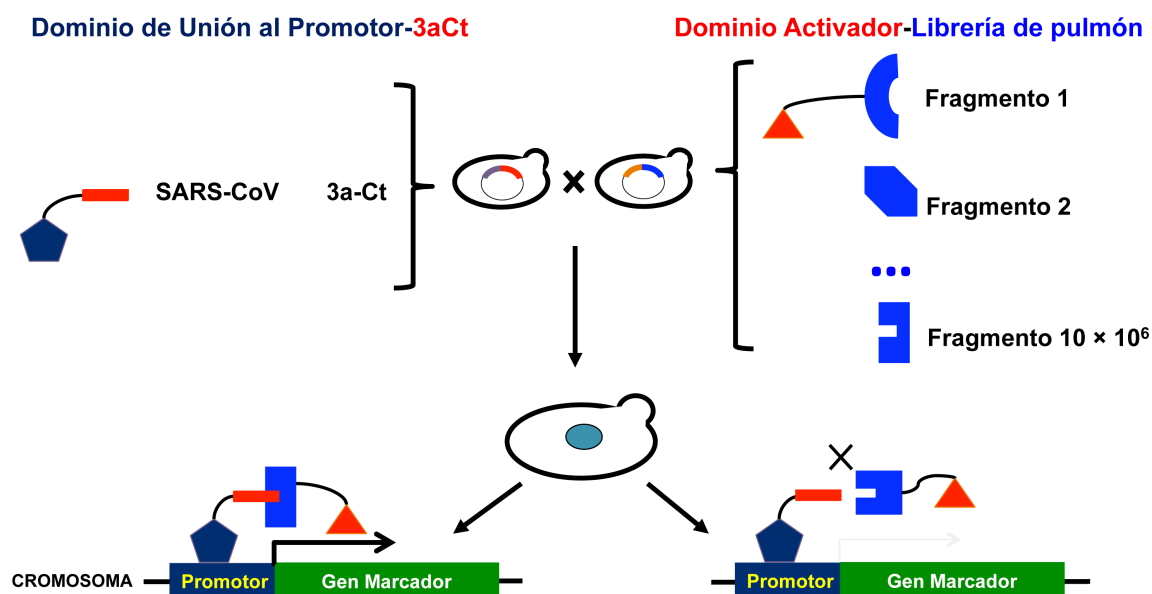
## 6. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES QUE INTERACCIONAN CON LA PROTEÍNA 3a

Se ha mostrado que la proteína 3a está implicada en la virulencia y replicación del SARS-CoV, pero aún no se ha identificado el mecanismo específico mediante el que actúa. Para averiguar este mecanismo de virulencia se identificaron las proteínas celulares que interaccionan con esta proteína. Para ello, se utilizó una plataforma de formación de doble híbrido de levadura (Y2H) (Hybrigenics, Francia) (**Figura 22**). El dominio carboxilo terminal de la proteína 3a se utilizó para la captura, analizando solamente la unión de los aminoácidos 133 al 274 de esta proteína, para evitar la inclusión de los dominios transmembrana, dado que en este sistema podrían interferir con su localización intracelular y con la unión a otras proteínas. Como ligando, se utilizó una librería de cDNAs de pulmón humano con más de 10 millones de

fragmentos independientes, dado que SARS-CoV es un virus respiratorio que infecta a humanos.



**Figura 21. Virulencia causada por los mutantes del SARS-CoV que combinan la eliminación de los PBM de las proteínas 3a y E.** (A) Esquema de los mutantes generados combinando mutaciones en los PBMs de las proteínas 3a y E que los suprimen. A la derecha se muestran los títulos de los virus. Los datos mostrados son la media y desviación estándar resultado de tres experimentos. (B) Se inocularon grupos de cinco ratones de 16 semanas de edad sin virus (PBS, círculos grises), con 100000 ufp del virus parental (WT, círculos negros), o con los mutantes generados mediante ingeniería genética sin el PBM de la 3a (3a-PBM<sup>-</sup>, diamantes rojos), sin el PBM de la E (E-PBM<sup>-</sup>, círculos ocre) o sin ambos ([3a,E]-PBM<sup>-</sup>, círculos verdes) Se determinaron las pérdidas de peso medias (gráfica de la izquierda) y la supervivencia (gráfica de la derecha) durante 10 días. Las barras de error representan la desviación estándar del peso de los ratones en cada condición experimental.



**Figura 22. Esquema del experimento de Y2H para estudiar la interacción de la proteína 3a del SARS-CoV con proteínas celulares.** Se transformaron levaduras con un plásmido de captura expresando el dominio de unión a DNA de GAL4 fusionado al dominio carboxilo-terminal de la proteína 3a del SARS-CoV. Otras levaduras se transformaron con una librería de genes de pulmón humano, cuyos genes están fusionados al dominio activador de GAL4. Ambas levaduras se aparearon. Si el dominio carboxilo de la proteína 3a del SARS-CoV se une a la proteína expresada por la librería de pulmón, se reconstituirá GAL4, dando lugar a la activación de un gen marcador (izquierda). Si no se da esta unión, el gen marcador no se activará (derecha).

Este tipo de ensayo permite identificar proteínas que se asocian físicamente en el medio intracelular y está basado en la activación transcripcional de genes identificables. Las interacciones que se observaron se clasificaron en función de su confianza. De esta manera, una interacción se considera de alta confianza cuando se han observado uniones positivas en dos evaluaciones independientes, o cuando se han identificado interacciones en un mismo ensayo con varios fragmentos solapantes de la proteína “ligando”. Una interacción se considera de confianza moderada cuando en todas las evaluaciones realizadas la interacción se ha observado al menos una vez. Por el contrario, se considera una interacción de baja confianza si participa en ella una proteína “ligando” con motivos de interacción muy promiscuos y que, por tanto, interacciona con un alto número de proteínas celulares sin mostrar especificidad (Formstecher y col., 2005).

Se identificaron 7 proteínas con un índice de confianza alto en la unión, 39 proteínas con un índice moderado y 10 proteínas en las que el índice fue bajo (**Tabla VIII**). A continuación, se realizó una búsqueda bibliográfica de las funciones de las 7 proteínas con las que se obtuvo una interacción de mayor confianza, observándose que todas ellas influyen en la actividad de



mediadores de la respuesta inmune como NF- $\kappa$ B, p38 MAPK o IFN- $\beta$  (**Tabla IX**). La proteína 3a, al interactuar con estas proteínas, induciría un desbalance de la respuesta inmune contribuyendo a una excesiva inflamación responsable de la patología, tal como se observó en las infecciones por el SARS-CoV.

**Tabla VIII. Proteínas celulares que interactúan con la proteína 3a de SARS-CoV**

Nombre del gen	Confianza de la interacción	Nombre del gen	Confianza de la interacción
CSTB	Alta	PRG4	Moderada
FN variant 5	Alta	RANBP2	Moderada
MYCBP2	Alta	RFXDC2	Moderada
NCOA6	Alta	RREB1	Moderada
PIK3C2G	Alta	SF3A1	Moderada
KLF10	Alta	SP140	Moderada
ZNF518A	Alta	TBX4	Moderada
AARSD1	Moderada	TENC1	Moderada
ABLIM1	Moderada	TGFB1/1	Moderada
ADNP2	Moderada	ZBTB20	Moderada
BLZF1	Moderada	ZFHX3	Moderada
C3ORF63	Moderada	ZHX1	Moderada
CAT	Moderada	ZYX	Moderada
CCDC88A	Moderada	GI: 31873671	Moderada
COBLL1	Moderada	GI: 28570306	Moderada
DLAT	Moderada	GI: 60391308	Moderada
EIF3S5	Moderada	GI: 21743742	Moderada
FAM82B	Moderada	GI: 15375167	Moderada
FLJ39143	Moderada	COPS5	Baja
FLNA	Moderada	DLST	Baja
HIVEP1	Moderada	EEF1A1	Baja
HIVEP3	Moderada	GMEB1	Baja
LAMC1	Moderada	HIVEP2	Baja
LOC100132247	Moderada	TAF1	Baja
LPP	Moderada	TOX4	Baja
PDLIM1	Moderada	ZBTB38	Baja
PI3KR4	Moderada	ZNF251	Baja
POGZ	Moderada	ZNF350	Baja



## 7. IDENTIFICACIÓN DE MOTIVOS PBM EN OTRAS PROTEÍNAS DE CoVs

Dada la importancia de los PBMs de SARS-CoV se decidió analizar la secuencia de las proteínas de CoVs de distintos géneros buscando secuencias que pudiesen conformar un motivo PBM en su extremo carboxilo terminal en la base de datos Uniprot (**Tabla X**). Se observó que la mayoría de los CoVs tienen como mínimo una proteína candidata a formar un PBM funcional en su carboxilo terminal.

Se han identificado 40 posibles PBMs en 32 especies de los cuatro géneros de CoVs. Se ha observado que tanto SARS-CoV como MERS-CoV, los dos CoVs humanos altamente patógenos, tienen tres proteínas con PBMs en su carboxilo terminal: las proteínas 3a, E y 7b en el caso de SARS-CoV y las proteínas 5, E y M en el caso de MERS-CoV. De hecho, MERS-CoV es el único CoV humano en el que hemos identificado un PBM en la proteína M. Las proteínas E y 5 del MERS-CoV son homólogas de las proteínas E y 3a del SARS-CoV, respectivamente, que se han estudiado en esta tesis doctoral.

**Tabla IX. Relación potencial entre las proteínas celulares que interactúan con la proteína 3a con mayor confianza y la influencia sobre la patogenicidad viral**

GEN	FUNCIONES RELACIONADAS CON LA PATOGENESIS VIRAL
CSTB	Inhibe la respuesta celular a IFN- $\beta$ mediante su interacción con STAT-1 (Rivera y col., 2016).
FN1	Implicado en el reconocimiento de ciertos patógenos, que lo utilizan para facilitar su entrada en la célula (Chen y col., 2017).
MYCBP2	E3-Ubiquitin-ligase: Ubiquitina DLK1, un activador de la p38 MAPK, que es degradada en el proteasoma. Por tanto, una deficiencia en MYCBP2 provoca un aumento de la actividad total de la p38 MAPK (Holland y col., 2011).
NCOA6	Interacciona con los mediadores de inflamación AP1 y NF- $\kappa$ B (S. K. Lee y col., 2000).
PIK3C2G	Activa Akt2, relevante para la respuesta inflamatoria mediante la activación de macrófagos (Vergadi y col., 2017).
KLF10	Regulador de la expresión de TGF- $\beta$ II (TGF- $\beta$ RII), relevante en la respuesta antiviral (Papadakis y col., 2015), y de la función supresora de los linfocitos con un importante efecto en el mantenimiento de auto-tolerancia e inmunosupresión (Cao y col., 2009).
ZNF518A	Función parcialmente conocida. Es un factor de transcripción de la familia de los KLFs, que son reguladores de la respuesta inmune (Carlson y col., 2006).

## 8. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES CON DOMINIOS PDZ QUE INTERACCIONAN CON LOS PBM DE PROTEÍNAS DE SARS-CoV Y MERS-CoV EN UN ENSAYO DE Y2H RESTRINGIDO AL PDZOMA HUMANO

En este trabajo se ha comprobado la importancia tanto en replicación como en virulencia de los motivos PBM presentes en las proteínas del SARS-CoV. Por ello, se ha realizado un estudio para identificar específicamente las proteínas celulares con dominios PDZ que interaccionan con estas proteínas virales.

**Tabla X. Distribución de PBMs en coronavirus**

GÉNERO	VIRUS	HOSPEDADOR	PROTEÍNA VIRAL	SECUENCIA DEL CARBOXILO TERMINAL
$\alpha$	FIPV	Felinos	E	...AYNPDE <b>AFLV</b>
			3a	...IEEVNS <b>HTVV</b>
			7b	...KINQHH <b>KTEL</b>
	HCoV-229E	Humanos	E	...DPFPKR <b>VIDF</b>
	NL63	Humanos	E	...APVPAE <b>VLNV</b>
	TGEV	Cerdos	E cepa FS772/70	...AYNHDG <b>ALLV</b>
			E cepa Purdue	...AYNPDG <b>ALLA</b>
			3a cepa FS772/70	...AYAKLG <b>LSTI</b>
	3a cepa Purdue	...IEEVNS <b>HIVV</b>		
	PEDV	Cerdos	E	...DPLPST <b>VIDV</b>
	PRCV	Cerdos	E	...AYNPDG <b>ALLV</b>
	CCoV	Cánidos	E	...AYNPDE <b>ALLV</b>
3a			...IEEVNS <b>HTVV</b>	
7a cepas BGF10, Insavc-1			...CCHRL <b>LVTLF</b>	
7a cepa K378			...CCYRL <b>LVTLI</b>	
7b	...KISQYQ <b>KSEL</b>			
$\beta$	SARS-CoV	Humanos	E	...SSEGV <b>PDLLV</b>
			3a	...EPTTTT <b>SVPL</b>
			7b	...QDLEEP <b>CTKV</b>
	MERS-CoV	Humanos	E	...KPPLPP <b>DEWF</b>
			5	...HIIAPS <b>SLIV</b>
			M	...ADIELA <b>LLRA</b>
	HKU1	Humanos	E	...VIPSTL <b>DDLI</b>
			N	...DDPYVE <b>DSVA</b>
	OC-43	Humanos	E	...KPPVLD <b>VDDV</b>
			N	...EPYTED <b>TSEI</b>
	HEV	Cerdos	E	...KPPVLD <b>VDDV</b>
			N	...EPYTED <b>TSEI</b>
	MHV	Murinos	E	...RLPLLE <b>VDDI</b>
			M	...SGADTA <b>LLRI</b>
			N	...PDGLEDD <b>DSNV</b>
	HCoV-4408	Bóvidos	E	...KPPVLD <b>VDDV</b>
			N	...EPYTED <b>TSEI</b>
	BCV	Bóvidos	HE (solo en cepa F15)	...YFMVEN <b>GTRL</b>
			N	...PDGLEDD <b>DSNV</b>

Tabla X. Distribución de PBMs en coronavirus (continuación)

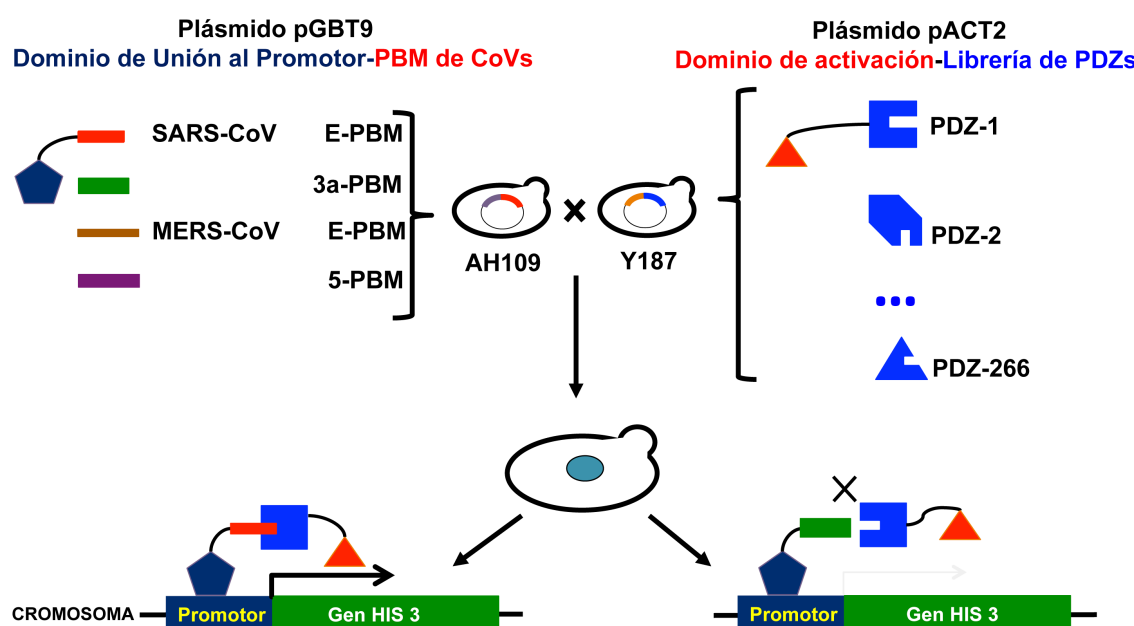
GÉNERO	VIRUS	HOSPEDADOR	PROTEÍNA VIRAL	SECUENCIA DEL CARBOXILO TERMINAL
$\gamma$	IBV	Aves	E	-
			5a	...LAYTPTQSLV
	TCoV	Aves	E	-
			S	...FSNSVNSSLV
			5a	...LVCTPTQSLV
	SW1	Ballena beluga	E	...PRNSKDGEYV
			5c	...CIGNDAYLGV
			M	...KTETEKLYSV
			ORF9	...NRKAYGSDEV
	HKU22	Delfín nariz de botella	N	...GTGDLEWSEA
			E	...PRNSKDGEYV
			5c	...CIGNDAYLGV
			M	...KTETEKLYSV
			NS9	...NRKAYGSDEV
$\delta$	HKU15	Cerdos	N	...GTGDLEWSEA
			5c	...CIGNDAYLGV
			M	...KTETEKLYSV
	ALCoV/GX/F230/06	Leopardo	NS9	...NRKAYGSDEV
			N	...AFEIKQESAA
	HKU16	Aves	NS7	...RVWLILASWL
			NS6	...SLQVILEEEI
	HKU17	Aves	N	...EIKRDEESTA
			E	-
	HKU18	Aves	N	...AFEIKQESAA
			E	-
	HKU19	Aves	N	...NAFEFKSSDA
			-	-
	HKU20	Aves	-	-
			-	-
			-	-
	HKU21	Aves	E	...HQPFRNSFSV
			NS7a	...VKRKSLIDSA
			NS7b	...SDADISDDA

Además de los PBMs de las proteínas E y 3a de SARS-CoV, se han incluido en este estudio los PBMs de las proteínas E y 5 del MERS-CoV, otro CoV humano emergente que causa patogenicidad y que se está diseminando en la actualidad.

Se decidió estudiar el PBM de estas dos proteínas de MERS-CoV porque son homólogas a las proteínas E y 3a de SARS-CoV, que son factores de virulencia tal y como se ha demostrado en esta tesis doctoral. Se analizaron las interacciones de estos PBMs virales con los dominios PDZ celulares mediante un ensayo de Y2H más restringido al realizado anteriormente, utilizando como ligando cada uno de los 266 dominios PDZ conocidos en el genoma humano. Asimismo, también se utilizaron como ligando 44 construcciones de los dominios PDZ que se encuentran en tándem dentro de la misma proteína, a menos de 15 aminoácidos de distancia, dado que se ha sugerido que estos dos dominios PDZ situados tan próximos que podrían actuar como una unidad funcional (Luck y col., 2012). Como captura

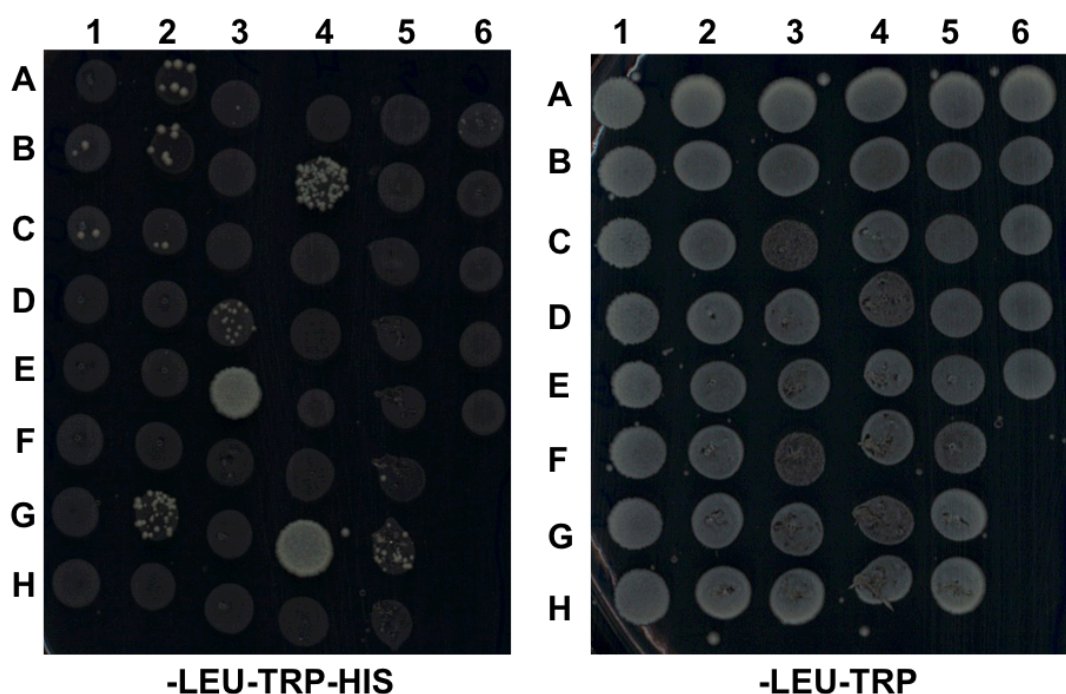
se utilizaron los 15 últimos aminoácidos de cada una de las proteínas virales que incluían la secuencia del PBM más relevante en la unión, formada por los cuatro aminoácidos de su extremo carboxilo terminal. Como control negativo de la interacción, se utilizaron los mismos péptidos de captura sin estos cuatro aminoácidos. El proceso se encuentra detallado en la **Figura 23**.

Los plásmidos pGBT9 y pACT2, con los que se transformaron ambas cepas de levadura, confieren la capacidad de crecer en medios sin triptófano y leucina, respectivamente. Si después del apareamiento interaccionaban el PBM y el PDZ, se reconstituiría el factor de transcripción GAL4, lo que llevaría a la expresión del gen HIS3, permitiendo que las levaduras crezcan en un medio sin histidina. Por esta razón, después del apareamiento se crecieron las levaduras en medio sin leucina y triptófano como control del apareamiento y en medio sin leucina, triptófano e histidina, para comprobar si había unión entre los PBMs y los dominios PDZs. Se muestra un ejemplo de uno de estos experimentos en la **Figura 24**.



**Figura 23. Esquema del experimento de Y2H para estudiar la interacción de los PBMs de SARS-CoV y MERS-CoV con los dominios PDZ humanos.** Levaduras de la cepa AH109 son transformadas con un pGBT9 expresando el dominio de unión a DNA de GAL4 fusionado al los últimos 15 aminoácidos de las proteínas E y 3a de SARS-CoV y E y 5 de MERS-CoV. Levaduras de la cepa Y187 son transformadas con una librería de todos los PDZ humanos fusionados al dominio activador de GAL4. Se aparean ambas levaduras. Si el PBM interacciona con el PDZ en cuestión, se reconstituirá GAL4, dando lugar a la expresión de HIS3 (izquierda), permitiendo a las levaduras crecer en un medio sin histidina. Si por el contrario, no se da esta unión, el gen HIS3 no se expresará (derecha).

Los ensayos se realizaron por triplicado y se consideraron positivas aquellas interacciones identificadas al menos una vez en los tres ensayos realizados (**Tabla XI**). En ningún caso se detectaron interacciones de los PDZ con péptidos de captura sin PBM, que se utilizaron como control negativo. Para seleccionar de entre las proteínas celulares con dominios PDZ aquellas que pudieran intervenir en las interacciones virus-hospedador, se realizó un análisis bibliográfico detallado de cada una de las proteínas con dominios PDZ que interaccionaron con los PBMs de MERS-CoV y SARS-CoV. Se valoró que entre las funciones descritas para cada proteína, hubiese alguna potencialmente relacionada con la inmunopatología que causan estos dos CoVs, asociadas fundamentalmente con la inflamación exacerbada del pulmón de los ratones infectados.



**Figura 24. Ensayo de doble híbrido de levadura restringido al PDZoma humano.** A modo de ejemplo, se muestra un resultado representativo de estos ensayos de Y2H. Cada círculo (desde el A1 hasta el E6) representa una colonia de levadura expresando un dominio PDZ distinto (los últimos 53 dominios de la librería). Se considera que un PBM interacciona con un PDZ, si se observa crecimiento de las colonias en el medio sin leucina, triptófano e histidina (izquierda). Se aprecia crecimiento de todas las colonias en el medio sin leucina y triptófano (derecha) indicando que el apareamiento ha tenido lugar correctamente.

Esta búsqueda se realizó utilizando las bases de datos Genecards y Genebank, con el fin de identificar las funciones principales de estos genes. Sin embargo, en la mayoría de los casos, aparentemente, ninguna de las funciones principales descritas para cada gen estaba relacionada con la inmunopatología, por lo que fue necesario realizar una búsqueda

utilizando como fuente de información la base de datos bibliográfica Pubmed, que proporciona información exhaustiva de la mayoría de los genes. También se realizó una búsqueda bibliográfica para comprobar si se hubiese descrito previamente una relación entre cada una de estas proteínas PDZ y otras infecciones virales. El resultado de esta prospección se ha resumido en la **Tabla XII**.

**Tabla XI. Proteínas celulares con dominios PDZ que interaccionan con los PBMs de las proteínas E y 3a de SARS-CoV y con las proteínas E y 5 de MERS-CoV**

SARS-E-PBM	SARS-3a-PBM	MERS-E-PBM	MERS-5-PBM
Sintenina (1-2)		Sintenina (1-2)	Sintenina (1-2)
PTPN13 (4)		PTPN13 (4)	PTPN13 (4)
PICK1 (1)			PICK1 (1)
APBA2 (1-2)	APBA1 (1-2)	APBA1 (1-2) APBA2 (2) APBA3 (1-2)	
LNK1 (1-2) LNK2 (1-2)		LNK2 (1-2) LNK4 (2)	LNK1 (1-2) LNK2 (1-2)
DLG1 (1-2)		DLG1 (1-2) DLG3 (1-2)	
GORASP1 (1-2)		GORASP2 (1-2)	GORASP1 (1-2) GORASP2 (1-2)
GRIP1 (4-5; 5-6) GRIP2 (5-6)	GRIP1(5-6)	GRIP1(5-6) GRIP2 (1-2; 2-3)	
PATJ (8-9)		PATJ (1-2; 8-9)	PATJ (8-9)
		MPDZ (1-2)	MPDZ (1-2)
PDZD2 (5-6)			
		SCRIB (3-4)	SCRIB (3-4)
		SNTG2 (1)	
		PSMD9 (1)	
		TJP3 (1; 3)	
		USH1C (1-2)	

Se muestra entre paréntesis el PDZ de la proteína celular cuya interacción se ha identificado con los PBMs virales. Los PDZ unidos por un guión hacen referencia a los dominios PDZ en tándem.

**Tabla XII. Funciones descritas para las proteínas con dominios PDZ que interactúan con los PBM de CoV**

PROTEÍNA PDZ	Funciones principales	Relación con la infectividad viral
Sintenina	Tráfico celular Adhesión celular Apoptosis Activación de p38 MAPK <sup>1</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Su interacción con el PBM de la proteína E de SARS-CoV induce inflamación<sup>2</sup></li> <li>• Participa en la endocitosis de HPV<sup>3</sup></li> <li>• Interacciona con LMP1 de Epstein-Barr<sup>4</sup></li> <li>• La nucleocápsida de VIH imita su PDZ para promover la gemación de los virus<sup>5</sup></li> </ul>
PTPN13	Tirosín-fosfatasa Proliferación celular Apoptosis Activación de NF-κB <sup>6</sup>	No descrita
PICK1	Sinaptogénesis Localización de PKC Regulación sistema inmune <sup>7</sup>	No descrita
APBA1	Alzheimer Tráfico vesicular	Sobrexpresada por tat de VIH <sup>8</sup>
APBA2	Alzheimer Tráfico vesicular	No descrita
APBA3	Alzheimer Tráfico vesicular Activación NF-κB <sup>9</sup>	Ratones APBA3 <sup>-/-</sup> con mejor pronóstico después de la infección por el virus de la gripe <sup>9</sup>
DLG1	Desarrollo embrionario Transducción de señales Sinapsis Proliferación celular Activación de linfocitos T <sup>10</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interacciona con los PBM de las siguientes proteínas virales, promoviendo oncogénesis: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Tax-1 de HTLV1<sup>11</sup></li> <li>○ E4-ORF1 de adenovirus<sup>12</sup></li> <li>○ E6 de HPV<sup>13</sup></li> </ul> </li> <li>• Interacciona con el PBM de NS1 del virus de la gripe disociando las adhesiones celulares oclusivas<sup>14</sup></li> </ul>
DLG2	Sinapsis	No descrita
GORASP1	Estructura Golgi Apoptosis	Su actividad está modificada por la infección con HCMV <sup>15</sup>
GORASP2	Estructura Golgi Activación de células dendríticas <sup>16</sup>	No descrita
GRIP1	Sinapsis	No descrita
GRIP2	Sinapsis	Interacciona con NS5 de WNV <sup>17</sup>
LNx1	E3-Ubiquitin-ligasa Proliferación celular Activación de células T <sup>18</sup>	Se une a la proteína np9 del retrovirus endógeno humano K contribuyendo a la tumorigénesis <sup>19</sup>
LNx2	E3-Ubiquitin-ligasa Proliferación celular	No descrita



**Tabla XII. Funciones descritas para las proteínas con dominios PDZ que interactúan con los PBM de CoV (continuación)**

PROTEÍNA PDZ	Funciones principales	Relación con la infectividad viral
MUPP1	Uniones celulares oclusivas Transducción de señal Sinapsis Extravasación de linfocitos <sup>21</sup>	Interacciona con los PBM de las siguientes proteínas promoviendo oncogénesis: <ul style="list-style-type: none"> <li>• E6 de HPV-18<sup>22</sup></li> <li>• E4-ORF1 del adenovirus 9<sup>22</sup></li> </ul>
PATJ	Uniones celulares oclusivas Polaridad celular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interacciona con los PBM de las siguientes proteínas promoviendo oncogénesis: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ E6 de HPV<sup>23</sup></li> <li>○ E4-ORF1 de adenovirus<sup>24</sup></li> </ul> </li> <li>• Tiene una función antiviral durante la infección con Dengue<sup>25</sup></li> </ul>
PDZD2	Desarrollo embrionario Comunicación célula-célula	No descrita
PSMD9	Proteasoma Inmunoproteasoma <sup>26</sup>	No descrita
SCRIB	Polaridad celular Supresión de tumores Activación linfocitos T Regulación sistema inmune <sup>27</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interacciona con los PBM de las siguientes proteínas promoviendo oncogénesis: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ E6 de HPV<sup>28</sup></li> <li>○ Tax-1 de HTLV1<sup>29</sup></li> <li>○ NS4B de HCV<sup>30</sup></li> </ul> </li> <li>• Interacciona con el PBM de la NS5 de TBEV inhibiendo la respuesta a interferón<sup>31</sup></li> <li>• Interacciona con el PBM de la NS1 del virus de la gripe inhibiendo la apoptosis y disociando las uniones celulares oclusivas<sup>32</sup></li> </ul>
SNTG2	Sinapsis neuromuscular	No descrita
TJP3	Uniones oclusivas Mitosis	No descrita
USH1C	Cilios sensoriales	No descrita

REFERENCIAS: <sup>1</sup>(Boukerche y col., 2007); <sup>2</sup>(Jimenez-Guardeño y col., 2014); <sup>3</sup>(Grassel y col., 2016); <sup>4</sup>(Rider y col., 2018); <sup>5</sup>(Sette y col., 2016); <sup>6</sup>(Nakai y col., 2000); <sup>7</sup>(Zhao y col., 2012); (Xie y col., 2016); <sup>8</sup>(Carvalho y col., 2017); <sup>9</sup>(Uematsu y col., 2016); <sup>10</sup>(Lasserre y col., 2010); (Crogetti y col., 2014); (Kuras y col., 2012); <sup>11</sup>(Marziali y col., 2017); <sup>12</sup>(Kong y col., 2014); <sup>13</sup>(Krishna Subbaiah y col., 2012); <sup>14</sup>(Golebiewski y col., 2011); <sup>15</sup>(Rebmann y col., 2016); <sup>16</sup>(Stein y col., 2015); <sup>17</sup>(Melik y col., 2012); <sup>18</sup>(D'Agostino y col., 2011); <sup>19</sup>(Armbruster y col., 2004); <sup>20</sup>(Poirson y col., 2017; Vincentelli y col., 2015); <sup>21</sup>(Ebnet y col., 2004; Hamazaki y col., 2002); <sup>22</sup>(S. S. Lee y col., 2000); <sup>23</sup>(Storrs y Silverstein, 2007); <sup>24</sup>(Latorre y col., 2005); <sup>25</sup>(Afroz y col., 2016); <sup>26</sup>(Rock y Goldberg, 1999); <sup>27</sup>(Ludford-Menting y col., 2005; Zheng y col., 2016); <sup>28</sup>(Thomas y col., 2005); <sup>29</sup>(Arpin-Andre y Mesnard, 2007); <sup>30</sup>(Hu y col., 2016); <sup>31</sup>(Werme y col., 2008); <sup>32</sup>(Golebiewski y col., 2011).

En la **Tabla XII** se puede observar que hay candidatos muy prometedores cuya interacción con los PBM de SARS-CoV y MERS-CoV podría ser responsable de la patología del virus, debido a que causa una alteración de la respuesta inmune. Este es el caso de los genes



PTPN13, PICK1, APBA3, DLG1 o SCRIB ya que están implicados en la activación o atenuación de la respuesta inmune.

Para confirmar esta hipótesis, primero se confirmarán las interacciones que se han identificado mediante Y2H utilizando técnicas alternativas como inmunofluorescencia o coimmunoprecipitación. Después de confirmarlas, se estudiará en detalle cómo influye la interacción de las proteínas virales de SARS-CoV y MERS-CoV en la actividad de estas proteínas y en las rutas celulares en las que están implicadas. Esta información nos permitirá describir nuevos aspectos de la interacción de los CoVs con su hospedador que serán útiles en el desarrollo de nuevas terapias antivirales o vacunas basadas en el bloqueo de las interacciones de los PBMs de CoVs con los PDZ celulares.

## **DISCUSIÓN**

En esta tesis se realiza un estudio comparativo de la relevancia en replicación y virulencia de las tres viroporinas del SARS-CoV, las proteínas E, 3a y 8a. El estudio se ha centrado en dos dominios funcionales relevantes en patogenicidad viral que hemos identificado en estas proteínas: el responsable de la actividad CI y el motivo de unión a dominios PDZ. En este análisis se ha investigado la posible complementariedad funcional entre estas proteínas con motivos funcionales potencialmente redundantes. Asimismo, se han identificado los dominios PDZ celulares con los que interaccionan las proteínas E y 3a del SARS-CoV y E y 5 de MERS-CoV lo que contribuye a una mejor comprensión de las interacciones virus-huésped en infecciones por coronavirus. Este trabajo se ha basado en observaciones previas de nuestro laboratorio que mostraron que la delección del gen E atenuaba el SARS-CoV (DeDiego y col., 2011), y que tanto su actividad canal iónico como su motivo PBM eran factores de virulencia (Jimenez-Guardeño y col., 2014; Nieto-Torres y col., 2014). Los resultados de estos estudios han contribuido de forma significativa a identificar las proteínas virales que contribuyen a la virulencia del SARS-CoV, y también a la determinación de proteínas celulares que median esta virulencia y a los posibles mecanismos responsables de la patogenicidad del SARS-CoV y del MERS-CoV.

Para determinar la implicación de las proteínas 3a, E y 8a del SARS-CoV en la producción viral y patogénesis se generaron tres virus recombinantes adaptados a crecer en ratón mediante genética reversa. En cada uno se delecionó una de las viroporinas. La virulencia de estos mutantes se evaluó en ratones BALB/c. Este modelo animal reproduce los principales síntomas clínicos observados durante la infección de humanos por el SARS-CoV. Ninguna de las tres proteínas fue esencial para la replicación viral en cultivos celulares o en el modelo experimental ratón, pero las proteínas 3a y E fueron necesarias para una producción viral óptima, en especial la proteína E. Además, estas proteínas mostraron un papel esencial en la virulencia del SARS-CoV dado que su eliminación dio lugar a la atenuación del mismo.

La actividad canal iónico de la proteína 3a se caracterizó en bicapas lipídicas artificiales y por primera vez se mostró que esta proteína forma un canal iónico no dependiente de voltaje, que conduce iones de sodio, potasio y calcio. Asimismo, se mostró que este canal iónico tenía preferencia por cationes en presencia de sodio y potasio, pero no mostró preferencia por ningún ion en concreto en presencia de calcio. Se determinó que los residuos Y91, H93 y Y109 de la proteína 3a eran necesarios para su actividad CI, lo que nos permitió generar virus sin esta actividad introduciendo mutaciones puntuales en estos residuos. Ello nos facilitó demostrar que la actividad canal iónico de la proteína 3a no afecta significativamente a la replicación o virulencia del SARS-CoV, en contraste a la actividad CI de la proteína E que afecta de forma decisiva a la patogenicidad. Esta conclusión se evidenció al

caracterizar *in vivo* variantes del SARS-CoV con mutaciones que suprimían la actividad CI de la proteína 3a y que, sin embargo, eran virulentos.

De forma similar, se generó una variante del SARS-CoV mediante genética reversa en la que se suprimió el PBM de la proteína 3a. Este virus se caracterizó en el modelo experimental del ratón y se observó que era tan virulento como el virus parental y que presentaba títulos virales similares. Estos datos permitieron concluir que el PBM de la proteína 3a no era relevante de forma significativa en replicación y virulencia, en contraste al PBM de la proteína E.

Las proteínas E y 3a del SARS-CoV deben de estar presentes para que este virus sea viable, dado que al eliminar los dos genes simultáneamente no se recuperó el virus. Esto mostró la existencia de una redundancia funcional entre las proteínas E y 3a. Ambas proteínas ejercen su complementariedad desde compartimentos celulares distintos dado que la proteína E se acumula en el ERGIC y la 3a en un compartimento celular sin identificar. Para localizar el dominio responsable de esta complementariedad se generó una colección de mutantes sin la proteína 3a, cada uno de los cuales incluía una proteína E con una mutación que en cada virus recombinante era distinta y se desplazaba a lo largo de todo el gen E. El análisis de los distintos mutantes de delección mostró que, si se elimina una de las viroporinas E o 3a, el motivo PBM de la otra es esencial para la viabilidad del virus.

En esta tesis se ha demostrado que existe una jerarquía entre los PBMs de las proteínas E y 3a mediante la generación de virus en los que se eliminó uno o los dos PBMs de ambas proteínas. Se mostró que la virulencia de los mutantes generados disminuyó significativamente cuando se suprimió el PBM de la proteína E tanto en presencia como en ausencia del PBM de la proteína 3a. Ello indicaba que, el PBM de la proteína 3a no tuvo una relevancia significativa en virulencia en el modelo experimental utilizado.

Dada la repercusión de la unión de motivos virales PBM a dominios PDZ celulares, demostrada en la presente tesis y en anteriores trabajos de este laboratorio (Jimenez-Guardeno y col., 2015; Jimenez-Guardeno y col., 2014), se estudiaron las proteínas celulares con dominio PDZ a las que se unen los PBMs de las proteínas E y 3a del SARS-CoV y E y 5 de MERS-CoV utilizando la técnica del doble híbrido de levadura. La verificación de estas interacciones utilizando técnicas adicionales y el estudio de su implicación en la replicación y virulencia de estos virus proporcionará nuevos conocimientos para abordar el estudio de la interacción de los coronavirus con el hospedador.

## 1. RELEVANCIA DE LAS VIROPORINAS DEL SARS-CoV EN REPLICACIÓN Y VIRULENCIA

Las proteínas virales con actividad canal iónico son relevantes para la replicación y la patogénesis viral y participan en multitud de procesos fisiológicos, por lo que su estudio tiene un interés creciente (Griffin, 2009; Hover y col., 2017; Nieva y col., 2012).

El SARS-CoV codifica tres viroporinas: 3a, E y 8a (Chen y col., 2011; Liao y col., 2004; Lu y col., 2006). En resultados previos de este laboratorio, se había mostrado que una variante del SARS-CoV con la proteína E deletada estaba atenuada en ratones y presentaba una disminución en su título viral de dos unidades logarítmicas respecto del virus silvestre (DeDiego y col., 2007). Comparativamente, la eliminación de la proteína 3a, también con actividad canal iónico, supuso una ligera reducción de media unidad logarítmica del título viral en células Vero E6 en relación con el virus parental (**Figura 7A**). Sin embargo, *in vivo* los títulos del SARS-CoV-Δ3a disminuyeron una unidad logarítmica (**Figura 7B**), indicando que la proteína 3a es necesaria para alcanzar niveles óptimos de replicación del SARS-CoV. Este resultado es similar al mostrado en otras publicaciones que indican una pequeña disminución en los títulos del SARS-CoV-Δ3a en células VeroE6 pero no se corresponde con los títulos que los autores observaron *in vivo* (Yount y col., 2005). Sin embargo, estos trabajos se realizaron con la cepa Urbani del SARS-CoV que solo causa una patología leve, en contraste con la cepa viral adaptada a ratón utilizada en esta tesis.

La reducción en el título del virus mutante SARS-CoV-Δ3a podría estar asociada con el papel de la proteína 3a en la reestructuración de las membranas internas que se observa en células infectadas por el SARS-CoV, incrementando el número de vesículas intracelulares y promoviendo con ello la liberación de partículas virales siguiendo un proceso no lítico (Freundt y col., 2010).

Alternativamente, la reducción en virulencia del SARS-CoV-Δ3a se podría deber a la inducción de apoptosis por la proteína 3a (Chan y col., 2009; Freundt y col., 2010), o a un aumento de la inducción de inflamación mediante la activación de citoquinas proinflamatorias como IL-8 y RANTES (CCL5) (Kanzawa y col., 2006). La atenuación observada con el mutante Δ3a también se podría deber a su incapacidad para activar una respuesta proinflamatoria exacerbada, resultando en la supervivencia de los ratones inoculados. De hecho, en un análisis histopatológico, los pulmones de los ratones infectados por el SARS-CoV-Δ3a mostraron menor inflamación que los pulmones de ratones infectados por el virus parental (**Figura 9**). Esta hipótesis se refuerza por los resultados similares obtenidos en los pulmones de ratones infectados por un virus con la proteína E deletada, que debió su atenuación a una reducción de la respuesta proinflamatoria del huésped (DeDiego y col., 2007; DeDiego y col., 2014).

Se ha mostrado que la delección de la proteína 8a del SARS-CoV no presentó en general un efecto significativo en la replicación y virulencia en ratones (**Figuras 7 y 8**). Este resultado se refuerza con la observación de que la ORF8 se delecionase en humanos durante la pandemia del SARS-CoV del año 2003 y que virus con delecciones en este gen fuesen recuperados de pacientes que murieron por la infección del SARS-CoV (Chiu y col., 2005), indicando que el gen 8a no se requiere para la patogenicidad del SARS-CoV. Sin embargo, virus sin las proteínas 8a y 3a, mostraron títulos 10 veces menores a los del virus parental (**Tabla VI**), lo que sugiere fuertemente que cuando ambas proteínas se delecionan simultáneamente, la replicación viral se ve afectada de forma moderada.

Además del SARS-CoV, otros coronavirus codifican más de una viroporina. Sin embargo, el papel de estas proteínas solo se ha estudiado en detalle por nuestro laboratorio en el caso del SARS-CoV (DeDiego y col., 2011; Jimenez-Guardeño y col., 2014; Nieto-Torres y col., 2014; Nieto-Torres y col., 2015b). La proteína estructural E está conservada en todos los CoVs, al igual que otras viroporinas que están codificadas por genes accesorios de los CoVs. Se ha establecido un papel en replicación para las proteínas ns12.9 de HCoV-OC43 (R. Zhang y col., 2015), 4a de HCoV-229E (Zhang y col., 2014) y 3 de PEDV (Wang y col., 2012). El MERS-CoV, otro CoV altamente virulento, codifica dos proteínas homólogas a las E y 3a del SARS-CoV, las proteínas E y 5, respectivamente. Mientras que se ha descrito la actividad CI de la proteína E de MERS-CoV (Surya y col., 2015), la potencial actividad CI de la proteína 5 todavía no se ha estudiado detalladamente. Sin embargo, se espera que esta proteína tenga actividad CI debido a su similitud con las viroporinas 3a del SARS-CoV, 4a del HCoV-229E y 3 del PEDV. Esta similitud radica en que el gen se encuentra entre los genes S y E (Muller y col., 2010), en que tiene 3 DTMs de los cuales los DTMs 2 y 3 están situados muy próximos en la proteína, y en que contiene una mayor cantidad de aminoácidos polares en los DTMs 2 y 3 en comparación con el DTM 1 (**Figura 25**). Esta observación es relevante sobre todo si tenemos en cuenta que en el caso de la proteína 3a del SARS-CoV, la única de las cuatro viroporinas cuya actividad canal iónico ha sido estudiada en profundidad, son los DTMs 2 y 3 los que están implicados en la actividad CI de la proteína. Además, las proteínas E y 5 del MERS-CoV también tienen un PBM funcional en su carboxilo terminal, al igual que las proteínas E y 3a del SARS-CoV (**Tabla X**). De estos cuatro PBMs, se ha comprobado que tanto el de la proteína E de SARS-CoV como el PBM de la proteína E de MERS-CoV son necesarios para la patogénesis viral (Jimenez-Guardeño y col., 2014); Javier Gutierrez-Alvarez y Luis Enjuanes, resultados sin publicar).

	DTM 1	DTM 2	DTM 3
SARS-3a	TATIP <b>Q</b> ASLPFGWLIVIGVAFLAVFQ <b>S</b> ATKIIALNKRWQLALYKGF <b>Q</b> FTCNLLLLFVTIYSHLLLVAAGMEA <b>Q</b> FLYLYAL <b>I</b> YFL <b>Q</b> CINACRIIM		
HCoV-229E 4a	DGT <b>V</b> T <b>F</b> N <b>L</b> L <b>A</b> Y <b>T</b> IM <b>S</b> L <b>F</b> V <b>V</b> Y <b>F</b> AL <b>F</b> KARSHRGR-----AALIV <b>F</b> K <b>I</b> L <b>I</b> L <b>F</b> V <b>V</b> P <b>L</b> L <b>Y</b> WS <b>Q</b> ---AYI <b>I</b> AT <b>L</b> IA <b>V</b> IL <b>L</b> GR <b>F</b> F <b>H</b> T <b>A</b> W		
PEDV-3	PIR <b>Q</b> AS <b>N</b> VT <b>G</b> FL <b>F</b> TS <b>V</b> F <b>V</b> Y <b>F</b> AL <b>F</b> KASSLRN-----YIM <b>L</b> AAR <b>F</b> AV <b>V</b> FL <b>Y</b> C <b>P</b> LL <b>Y</b> CGALLD <b>A</b> TI <b>I</b> CCALIG <b>R</b> L <b>C</b> LV <b>C</b> F <b>Y</b> SW <b>R</b>		
MERS-5	YIP <b>A</b> SG <b>Y</b> VAALAV <b>N</b> V <b>C</b> L <b>I</b> P <b>L</b> LLLL <b>R</b> Q <b>D</b> TCRR <b>S</b> I <b>I</b> R-----TMV <b>L</b> Y <b>F</b> LV <b>L</b> Y <b>N</b> FL <b>L</b> AI <b>V</b> LV <b>N</b> G---V <b>H</b> Y <b>P</b> T <b>G</b> SC <b>L</b> IA <b>F</b> LV <b>I</b> L <b>I</b> L <b>W</b> F		

**Figura 25. Alineamiento de los DTMs de viroporinas de CoV.** Se muestra el alineamiento de los tres DTMs de las viroporinas 3a de SARS-CoV, 4a de HCoV-229E, 3 de PEDV y 5 de MERS-CoV. En naranja se muestran los DTMs descritos en la base de datos Uniprot KB, y en verde, los aminoácidos polares de los DTMs.

## 2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CANAL IÓNICO DE LA PROTEÍNA 3a Y LOCALIZACIÓN DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES PARA ESTA ACTIVIDAD

Los residuos implicados en la actividad CI de la proteína E se habían identificado previamente y se había caracterizado su actividad CI concluyendo que forma CIs no regulado por voltaje y de baja selectividad por cationes (Nieto-Torres y col., 2014; Verdía-Baguena y col., 2012).

En este trabajo se ha descrito que la proteína 3a forma canales iónicos no regulados por voltaje y que puede conducir iones de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> (**Figura 10**) al igual que la proteína E. La proteína 3a mostró una débil selectividad por cationes en presencia de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> pero en contraste a la proteína E, no mostró selectividad por ningún ión en presencia de Ca<sup>2+</sup> (**Tabla IV**). Estudios de la actividad CI en los mutantes contruidos de la proteína 3a revelaron que tanto el DTM2 como el DTM3 eran necesarios para reconstituir la actividad CI de la proteína 3a, particularmente los residuos Y91 y H93 del DTM2 y Y109 del DTM3 (**Figura 11**). Los cambios en las concentraciones de los tres iones que conduce la proteína 3a de SARS-CoV en los distintos compartimentos celulares son utilizados por la célula para facilitar distintos procesos celulares. El ejemplo mejor conocido es el del calcio. Cuando aumentan los niveles citoplásmicos de este ion se activa la producción de distintos mensajeros que pueden dar lugar a una gran variedad de cambios en la célula como la excitabilidad neuronal, exocitosis, apoptosis o la transcripción de ciertos genes (Berridge y col., 2000; Clapham, 2007). Además, tanto el calcio como el potasio son reguladores del sistema inmune mediante canales iónicos específicos para estos iones como Kcv1.3, CRAC o IKCa1 en linfocitos T y B que median su estimulación o inhibición (Cahalan y col., 2001). Por otro lado, y como ya se ha explicado en la introducción, el transporte vectorial de sodio es necesario para mantener la actividad de la barrera formada por el epitelio alveolar y evitar la acumulación de edema pulmonar. Interferir con este transporte provoca la patología pulmonar (Matalon y col., 2015). Son necesarios más estudios para describir cómo afecta la actividad canal iónico de la proteína 3a a estos procesos fisiológicos.

### 3. ANÁLISIS DE LA RELEVANCIA DE LA ACTIVIDAD CANAL IÓNICO Y PBM DE LA PROTEÍNA 3a EN REPLICACIÓN Y VIRULENCIA DEL SARS-CoV

Se ha descrito previamente que la actividad CI de la proteína E originaba desbalances intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  que activan el inflammasoma, induciendo una respuesta proinflamatoria exacerbada, acumulación de edema pulmonar y la muerte de los ratones utilizados como modelo animal experimental (Nieto-Torres y col., 2015b). Por tanto, se dedujo que la actividad CI de la proteína E del SARS-CoV es un factor de virulencia al igual que la actividad CI de la proteína M2 del virus de la gripe (Ichinohe y col., 2010), o la proteína NSP4 de rotavirus (Hyser y col., 2010; Zhang y col., 2000).

Dado que la actividad CI de la proteína E es un factor de virulencia mediada por la activación del inflammasoma (Nieto-Torres y col., 2014; Nieto-Torres y col., 2015b), se estudió si la actividad CI de la proteína 3a podría tener un papel similar. Mutaciones combinadas en el DTM3 de la proteína 3a atenuaron al virus posiblemente debido a un efecto directo sobre alguna función de la proteína o a una alteración de la estructura tridimensional de consecuencias similares. Mientras que el mutante DTM3<sup>-</sup> creció con títulos 10 veces menores que el virus nativo, el mutante DTM[2,3]<sup>-</sup> presentó títulos similares, lo que podría explicarse si las mutaciones introducidas en el DTM3 se compensasen estructuralmente con las del DTM2 cuando ambas mutaciones están presentes simultáneamente en la proteína 3a. Dado que no se observó ninguna correlación entre la actividad CI de la proteína 3a y los títulos y la patogenicidad del SARS-CoV, se concluyó que la actividad CI de la proteína 3a no afecta a la replicación y patogénesis del virus en contraste a la actividad CI de la proteína E.

El PBM de la proteína E es otro factor de virulencia del SARS-CoV (Jimenez-Guardeño y col., 2014). Asimismo, la proteína 3a incluye otro PBM con una secuencia distinta a la observada en la proteína E. Sin embargo, el análisis de la replicación y patogenicidad del mutante de la proteína 3a con un PBM delecionado no mostró ningún efecto en la producción viral o en virulencia (**Figura 14 y 15**). Además, se ha demostrado que sólo el PBM de la proteína E influye en la virulencia del SARS-CoV pero que la presencia o ausencia del PBM de la proteína 3a no tiene la misma relevancia en la patogenicidad del virus (**Figura 21**), lo que indica una jerarquía funcional entre los PBMs de las proteínas E y 3a, con una mayor influencia del dominio PBM de la proteína E en virulencia.

Existen factores alternativos que podrían explicar la diferente relevancia entre la actividad CI y los PBMs de las proteínas E y 3a del SARS-CoV. Mediante un ensayo de inmunofluorescencia se ha demostrado que ambas proteínas se encuentran en distintos compartimentos celulares durante la infección (**Figura 16A**), por tanto, la actividad CI de ambas proteínas puede provocar desbalances iónicos entre distintos compartimentos. La



proteína E está localizada en el ERGIC, un orgánulo con alta concentración de calcio, (Nieto-Torres y col., 2011) e induce la salida de este ion desde este orgánulo al citoplasma. Esto provoca la activación del inflamasoma, lo que lleva a una respuesta proinflamatoria aguda que está asociada con la patogenicidad viral (Chen y Subbarao, 2007; Nieto-Torres y col., 2015b). Dado que la proteína 3a no se encuentra en ninguno de los principales reservorios de calcio (**Figura 16B**), su actividad CI posiblemente estimule rutas de señalización distintas y probablemente con menos impacto en patogenicidad a la vista de los resultados obtenidos.

El PBM de la proteína E del SARS-CoV interacciona con la proteína celular Sintenina a través de sus dominios PDZ, activando la ruta de la p38 MAPK e induciendo una respuesta proinflamatoria exacerbada que provoca la muerte del hospedador (Jimenez-Guardeño y col., 2014). Sin embargo, es esperable que distintos PBMs muestren distintas preferencias por el conjunto de los más de 266 dominios PDZ presentes en más de 400 isoformas de proteínas celulares, cada una de ellas incluyendo entre uno y trece dominios PDZ (Luck y col., 2012). De hecho, cuando se ha estudiado la interacción de los PBMs de las proteínas E y 3a del SARS-CoV con los 266 PDZs humanos, los patrones de interacciones de ambos PBMs con proteínas celulares conteniendo motivos PDZ fueron significativamente distintos, tal como se esperaría de dos PBMs cuyas secuencias son diferentes (DLLV y SVPL, respectivamente) (**Tabla XI**). Es probable que la interacción entre el PBM de la proteína 3a y los PDZ celulares induzca una ruta de señalización que no medie patogenicidad para el huésped, o que esté activada con menor intensidad debido a la menor afinidad entre el PBM viral y el PDZ celular. Esto explicaría porqué un virus desprovisto del PBM de la proteína 3a no mostró ninguna diferencia significativa en patogenicidad respecto al virus parental.

#### **4. INTERDEPENDENCIA DE LAS TRES VIROPORINAS DEL SARS-CoV PARA LA VIABILIDAD VIRAL**

Para estudiar la interdependencia entre las viroporinas del SARS-CoV se analizó el efecto de delecionar una sola, combinaciones de dos, o las tres viroporinas. La proteína 8a se incluyó en estos estudios para determinar su potencial relevancia en la ausencia del resto de las viroporinas, pese a que no había mostrado un efecto significativo en el crecimiento del SARS-CoV cuando solamente se delecionó esta proteína. Sin embargo, se observó que el SARS-CoV no era viable cuando las proteínas 3a y E estaban ausentes al mismo tiempo, pero sí lo era en presencia de al menos una de las dos. Además, se demostró que la proteína E podía compensar la delección de la proteína 3a siempre que incluya un PBM funcional (**Figura 17**). Esta conclusión fue reforzada principalmente por el comportamiento de cinco virus recombinantes distintos: dos que restauraban la viabilidad en presencia de un PBM funcional ([ $\Delta 3a, E\Delta PBM(\text{rev})$ ] y [ $\Delta 3a, EPBM^*$ ]) y tres que no eran viables al no estar presente la proteína

3a ni el PBM de la proteína E ([ $\Delta 3a, E\Delta 6$ ], [ $\Delta 3a, E\Delta PBM$ ], [ $\Delta 3a, E\Delta PBM^-$ ]). Asimismo, la rápida reversión del codón de parada de la traducción que se introdujo precediendo a los nueve aminoácidos del carboxilo terminal de la proteína E que incluyen el dominio PBM fue biológicamente muy relevante, porque este mutante revertiente se seleccionó rápidamente después de un solo pase del virus en cultivos de células VeroE6. Probablemente se seleccionó el revertiente de este mutante y no del resto, porque es más probable revertir la alteración de un único codón que la de los cuatro codones del E-PBM<sup>-</sup>. Adicionalmente, se describió que la presencia de la proteína 3a con su PBM podía compensar la pérdida de la proteína E restaurando la replicación viral pero no la patogenicidad (**Figura 19**).

El requerimiento en replicación y virulencia de los PBMs del SARS-CoV también está reforzado por la observación realizada en anteriores trabajos de nuestro laboratorio en los que el mutante  $\Delta E$  evolucionó para introducir una nueva proteína transmembrana con un PBM para compensar por la pérdida de toda la proteína E, tanto en cultivos celulares como *in vivo* (Jimenez-Guardeno y col., 2015). En este trabajo, tres variantes del SARS-CoV- $\Delta E$  seleccionadas independientemente, partiendo de mutantes del SARS-CoV- $\Delta E$  ligeramente distintos incorporaron espontáneamente una proteína quimérica compuesta por el dominio N-terminal de la proteína M y un fragmento que incluye un PBM en su carboxilo terminal (Jimenez-Guardeno y col., 2015). Las tres proteínas quiméricas incorporadas por los tres virus tenían una estructura parecida, pero fueron distintas entre sí. No obstante, todos ellos contenían un PBM distinto. Adicionalmente, cuando se realizaron pases en ratones del virus SARS-CoV- $\Delta E$ , el virus espontáneamente incorporó un PBM interno en la proteína 8a.

Una observación adicional de distinta naturaleza, que refuerza considerablemente el requerimiento de un PBM en el extremo carboxilo terminal de la proteína E, es que estos motivos funcionales están filogenéticamente conservados en proteínas de todas las variantes de SARS-CoV y MERS-CoV que se han aislado en humanos, civetas, dromedarios y murciélagos (**Figura 26**). Asimismo, la conservación epidemiológica que existe en los distintos géneros de CoVs (**Tabla X**), es otro argumento que refuerza la importancia de los PBMs en la viabilidad de los coronavirus.

La importancia de los PBMs de las proteínas E y 3a del SARS-CoV radica en su posible interacción con proteínas celulares con dominios PDZ (Lee y Zheng, 2010). Estas interacciones participan en multitud de actividades celulares y se ha observado que su alteración tiene efectos significativos en el comportamiento de distintos virus (Bladt y col., 2002; Boeda y col., 2002; Hildebrand y Soriano, 1999; Subbaiah y col., 2011). Por ejemplo, el PBM de la oncoproteína E6 del papilomavirus humano (HPV-16) interacciona con muchas proteínas celulares con motivos PDZ lo que facilita la tumorigénesis y diseminación del virus

(Ganti y col., 2015). Por otro lado, distintas cepas del virus de la rabia (RABV) poseen distintos PBMs en la proteína G que condicionan su virulencia a través de la activación de ciertas rutas de señalización (Caillet-Saguy y col., 2015).

SARS-CoV PROTEÍNA E					
VIRUS	HOSPEDADOR	Nº AISLADOS	SECUENCIA AA	PBM	TIPO
SARS-CoV	HUMANO	> 100	N L N S S E G V P	D D L V	II
SARS-CoV	CIVETAS	> 20	N L N S S E G V P	D D L V	II
SARS-CoV-LIKE	MURCIÉLAGO <i>R. pusillus</i>	1	N L N S S V G V P	D D L V	II
SARS-CoV-LIKE	" <i>R. ferrumequinum</i>	1	N L N S S D C V P	D D L V	II
SARS-CoV-LIKE	" <i>R. blasii</i>	1	S L N S S Q E V P	E F L V	II

SARS-CoV PROTEÍNA 3a					
VIRUS	HOSPEDADOR	Nº AISLADOS	SECUENCIA AA	PBM	TIPO
SARS-CoV	HUMANO	166	I Y D E P T T T T	S V P L	II
SARS-CoV	HUMANO	3	I Y D E P M T T T	S V P L	II
SARS-CoV	CIVETAS	4	I Y D E P T T T T	S V P L	II
SARS-CoV-LIKE	MURCIÉLAGO <i>R. sinicus</i>	1	I Y D E P M T T T	S V P L	II
Zaria Bat-CoV	<i>H. commersoni</i>	1	I Y D E P P T T T	S V P L	II

MERS-CoV PROTEÍNA E					
VIRUS	HOSPEDADOR	Nº AISLADOS	SECUENCIA AA	PBM	TIPO
MERS-CoV	HUMANO	98	Q D S K P P L P P	D E W V	III
MERS-CoV	DROMEDARIO	17	Q D S K P P L P P	D E W V	III
MERS-CoV-LIKE	MURCIÉLAGO <i>N. capensis</i>	1	Q E S K P P L P P	E E W V	III
MERS-CoV-LIKE	" <i>V. superans</i>	1	Q E S K P P L P P	D E W V	III
MERS-CoV-LIKE HKU5	" <i>Pipistrellus</i>	6	Q E S H P P Y P P	E D W V	III
MERS-CoV-LIKE HKU4	" <i>T. pachypus</i>	7	Q E N R P P F P P	E D W V	III

MERS-CoV PROTEÍNA 5					
VIRUS	HOSPEDADOR	Nº AISLADOS	SECUENCIA AA	PBM	TIPO
MERS-CoV	HUMANO	97	V P L H I I A P	S L I V	II
MERS-CoV	DROMEDARIO	17	V P L H I I A P	S L I V	II
MERS-CoV-LIKE	MURCIÉLAGO <i>N. capensis</i>	1	V P L H I I A P S	V L S V	II
MERS-CoV-LIKE	" <i>V. superans</i>	1	V P L H I I A P S	V L S V	II
MERS-CoV-LIKE HKU5	" <i>Pipistrellus</i>	6	V P L H I I A P S	V L T V	II
MERS-CoV-LIKE HKU4	" <i>T. pachypus</i>	7	V P L H I I A P S	K L Y V	II

Figura 26. Conservación evolutiva de los PBMs de las proteínas E y 3a de SARS-CoV y E y 5 de MERS-CoV. Se muestra el alineamiento de dichos PBMs de virus aislados de distintas especies a lo largo de su evolución.

En el caso del virus de la gripe, la proteína NS1 tiene un PBM en su carboxilo terminal implicado en virulencia (Jackson y col., 2008). Adicionalmente, la proteína F11 del virus de la vacuna de la viruela tiene tanto un dominio PDZ como un PBM que median la diseminación del virus (Handa y col., 2013).

En conjunto, toda esta información ha permitido concluir que las proteínas E y 3a tienen en común dos características importantes, la actividad CI y los PBMs. Las actividades CI y del PBM de la proteína E están implicadas en la virulencia del SARS-CoV, en contraste a lo que hemos observado con los mismos motivos de la proteína 3a. Por tanto, se ha demostrado que estos motivos tienen distinto grado de relevancia en patogénesis, estando el PBM y actividad CI de la proteína E asociados con el grado de replicación y virulencia con mayor significancia que sus homólogos en la proteína 3a. Sin embargo, los resultados indican que el PBM de la proteína 3a si que es crítico para la viabilidad viral cuando la proteína E está delecionada. Estos resultados contribuyen a entender mejor el papel de las actividades CI y los PBMs de los CoVs y tiene un importante impacto en el diseño de futuras vacunas y antivirales, al facilitar la construcción de virus atenuados o la identificación de drogas que inhiban la acción del motivo PBM con proteínas celulares que incluyan dominios PDZ, respectivamente.

## **5. PROTEÍNAS CELULARES QUE INTERACCIONAN CON LA PROTEÍNA 3a**

Para investigar los mecanismos de acción de la proteína 3a del SARS-CoV, hemos mostrado primero que la proteína 3a afecta de forma significativa a la replicación y la virulencia del SARS-CoV. Para profundizar en el papel de la proteína 3a en la patogenicidad y en la replicación del SARS-CoV, se estudió la interacción de su dominio carboxilo terminal con proteínas celulares expresadas por una librería de pulmón humano mediante una plataforma de doble híbrido de levadura de Hybrigenics (Francia) (Formstecher y col., 2005). Se identificaron 56 proteínas celulares que interaccionaban con la proteína 3a del SARS-CoV, siete de ellas con un alto coeficiente de fiabilidad (**Tabla VIII**). Para identificar las proteínas con mayor potencial para influir en la patología producida por el SARS-CoV se analizaron las actividades más frecuentes de las proteínas celulares que interaccionan con el dominio carboxilo terminal de la proteína 3a con alta fiabilidad, revelando que todas ellas intervienen en la regulación de la respuesta inmune (**Tabla IX**).

Interesantemente, se ha descrito una relación entre algunas de estas proteínas y otros virus. Este es el caso de la cistatina B (CSTB), la fibronectina-1 (FN1) y el VIH. La CSTB inhibe la respuesta antiviral mediada por IFN $\beta$  en macrófagos, favoreciendo que estas células sean un reservorio del virus (Rivera y col., 2016). Dado que el SARS-CoV bloquea la producción de IFN $\beta$  (Spiegel y col., 2005), sería razonable proponer que la interacción de la proteína 3a con CSTB también inhibiese la respuesta a IFN $\beta$  contribuyendo a la inhibición de la respuesta al

interferón observada después de la infección por el virus. Por otro lado, la proteína de la envuelta del VIH gp120 interacciona con el dominio extracelular de FN-1 para favorecer la entrada del virus en las células diana (Plotnik y col., 2017). Dado que la proteína 3a está presente en la envuelta del virión (Shen y col., 2005) también podría interactuar con el dominio extracelular de FN-1 facilitando la infección viral.

La proteína 3a del SARS-CoV interacciona con las proteínas Myc Binding Protein 2 (MYCBP2) y Nuclear Co-activator 6 (NCOA6) que participan en la regulación de la p38 MAPK y de NF- $\kappa$ B respectivamente, que median la inflamación celular, y causan la virulencia del SARS-CoV (DeDiego y col., 2014; Holland y col., 2011; Jimenez-Guardeño y col., 2014; S. K. Lee y col., 2000). Más específicamente, la interacción de la proteína 3a con NCOA6 podría contribuir a la activación de NF- $\kappa$ B (Kanzawa y col., 2006).

La proteína 3a del SARS-CoV también interacciona con la Fosfatidilinositol-4-Fosfato-3-Kinasa Tipo 2 Gamma (PIK3C2G), un miembro de la familia de las PI3K conocidas por su papel en inflamación, que se podría estimular mediante esta interacción (Lupieri y col., 2015).

Finalmente, los factores de transcripción KLF10 y ZFN158A pertenecen a la familia de proteínas tipo Kruppel que tienen una importante función en la regulación de la actividad de las células del sistema inmune (Cao y col., 2009; Carlson y col., 2006; Papadakis y col., 2015). El SARS-CoV puede infectar este tipo de células, aunque generalmente de forma no productiva (Yilla y col., 2005). Probablemente, durante este proceso, SARS-CoV contribuye a la alteración de la respuesta inmune, lo que llevaría a una respuesta inflamatoria excesivamente elevada con producción de ARDS, edema pulmonar y finalmente la muerte. Durante la infección de las células del sistema inmune, la proteína 3a podría interactuar con la proteína PIK3C2G y los factores de transcripción KLF10 y ZFN158A inhibiendo su función y originando una respuesta inmune patológica.

Curiosamente, en estos ensayos de Y2H realizados frente a una librería que incluye todos los genes de pulmón humano, no se han identificado proteínas con dominio PDZ con las que interaccionase el PBM de la proteína 3a, a excepción de la proteína PDLIM1, detectada con una confianza moderada. La escasez de interacciones PBM-PDZ de este ensayo se puede deber a que en este caso, se utilizó como ligando una librería de todos los genes de pulmón, y por tanto, no enriquecida con genes de proteínas con dominios PDZ. Por esta razón, tampoco se utilizaron como ligando parejas de dominios PDZ dispuestas en tándem, que favorecen la interacción PBM-PDZ. Para identificar las interacciones que dependen del PBM de las proteínas virales se realizó un ensayo de Y2H usando como cebo solo los últimos 15 aminoácidos de dichas proteínas, que incluyen el PBM, y como ligando, cada uno de los dominios PDZ conocidos. Como se discutirá más adelante, con este nuevo ensayo se

consiguieron identificar varias proteínas celulares con dominios PDZ que interaccionan con los PBMs virales.

## 6. IDENTIFICACIÓN DE MOTIVOS PBM EN OTRAS PROTEÍNAS DE CoVs

Dada la importancia de los PBMs de SARS-CoV se estudió la presencia de motivos PBM en los distintos géneros de CoVs (**Tabla X**). Se ha observado un mayor número de estos motivos en CoVs de los géneros que provienen de murciélagos (*Alfacoronavirus* y *Betacoronavirus*) que en los que provienen de aves (*Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*). Esto sugiere que, durante la evolución de los CoVs, la incorporación de proteínas con PBM habría ocurrido antes en los virus de los géneros *Alfacoronavirus* y *Betacoronavirus*. Además, se ha identificado la presencia de un PBM en las proteínas E de todos los virus analizados de los géneros *Alfacoronavirus* y *Betacoronavirus*, pero no se ha localizado este motivo funcional en el carboxilo terminal de la proteína E de la mayoría de los coronavirus de aves, siendo la única excepción, el virus HKU22. Curiosamente, los CoV en los que se han detectado más PBMs en el carboxilo terminal de sus proteínas son los de mamíferos acuáticos del género *Gammacoronavirus*. En estos se han descrito hasta cinco proteínas portadoras de un PBM. En contraste, en los virus de aves HKU19 y HKU20 no se ha identificado ninguna proteína con un PBM en el carboxilo terminal.

De las tres proteínas con PBM que tienen tanto el SARS-CoV como el MERS-CoV, se han estudiado las dos que son homólogas: la E y 3a de SARS-CoV y la E y 5 de MERS-CoV, respectivamente. Queda pendiente para futuros trabajos el estudio de la relevancia del PBM de las proteínas M de MERS-CoV y 7b de SARS-CoV, recientemente identificados. Sin embargo, se considera poco probable que el PBM de la proteína 7b de SARS-CoV tenga un papel relevante en la replicación y virulencia del virus debido a que el virus SARS-CoV $\Delta$ [6-9b], generado previamente en este laboratorio, que carece de los genes 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b, mostró títulos virales y patogenicidad equivalentes a los del virus parental tanto en cultivos celulares como *in vivo* (DeDiego y col., 2008). Sin embargo, se ha observado que el PBM de la proteína 7b no está presente en las variantes del SARS-CoV aisladas de murciélago pero sí en las aisladas de civetas y humanos, indicando que el PBM de la proteína 7b podría haber participado en la adaptación del virus a humanos (Pfefferle y col., 2009).

## 7. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CON DOMINIOS PDZ QUE INTERACCIONAN CON LOS PBM DE PROTEÍNAS DE SARS-CoV Y MERS-CoV EN UN ENSAYO DE Y2H RESTRINGIDO AL PDZOMA HUMANO

Dada la importancia de las interacciones de los PBM virales con los dominios PDZ celulares se decidió estudiar este tipo de uniones específicas utilizando como ligando una librería

compuesta de los 266 dominios PDZ humanos (o PDZoma humano). Es importante tener en cuenta que estos 266 dominios se encuentran aproximadamente en 400 isoformas de proteínas celulares conteniendo un total de 1 a 13 dominios PDZ distintos por proteína. Se identificaron 42 interacciones con 24 proteínas distintas con dominios PDZ (**Tabla XI**). Los PBMs de las proteínas E y 3a del SARS-CoV y los de las proteínas E y 5 de MERS-CoV interaccionan con 12, 2, 19 y 10 proteínas PDZ, respectivamente. Dos de las proteínas identificadas, PTPN13 y Sintenina, también se identificaron en un ensayo Y2H, en el que se utilizó como cebo todo el dominio carboxilo terminal de la proteína E y como ligando, la misma librería de genes de pulmón que se usó previamente para estudiar las interacciones del carboxilo terminal de la proteína 3a (Hybrigenics, Francia) (Jimenez-Guardeño y col., 2014); Castaño-Rodríguez y Luis Enjuanes, resultados sin publicar) lo que apoya la validez de este ensayo de Y2H, más restrictivo. Muchas de estas interacciones se han observado tan sólo con parejas de PDZs en tándem dado que, tal como se ha descrito en la bibliografía, la formación de estos tándems favorece la funcionalidad de los dominios PDZ (Luck y col., 2012). Además, se ha descrito que los PBMs de proteínas que oligomerizan, como es el caso de las proteínas analizadas, pueden unirse con mayor afinidad a los dominios PDZ dispuestos en tándem (Long y col., 2003). Por otro lado, se considera significativo el hecho de que el PBM de la proteína 3a interaccionase solo con dos proteínas (APBA1 y GRIP1). Esto podría ser debido a que secuencia central de su PBM (los últimos cuatro aminoácidos de la proteína) muestre baja afinidad por los dominios PDZ o, alternativamente, a que el péptido que se utilizó como captura en estos ensayos y que consta de los últimos 15 aminoácidos de la proteína, no fuese suficientemente grande para que el PBM adoptase la conformación necesaria para interaccionar de forma óptima con los dominios PDZ. Otra posibilidad es que el PBM de la proteína 3a requiera modificaciones post-traduccionales para ser funcional y estas no se den en el contexto del péptido de 15 aminoácidos. La presencia de cinco aminoácidos fosforilables entre estos 15 residuos (Ser-4, Thr-5,-6,-7,-8) refuerza esta posibilidad, dado que una fosforilación de este tipo se ha descrito en el caso de los PBMs de la cadherina, Erb2, o Cx43, entre otros (Luck y col., 2012).

Se realizó una búsqueda bibliográfica para conocer la función de las 24 proteínas con dominios PDZ que interaccionaron con los PBM de CoVs con el fin de identificar proteínas celulares que, en principio, pudieran influir en la patogenicidad del virus (**Tabla XII**). En las bases de datos Genbank y Genecards se encuentran las actividades descritas más frecuentemente para estas proteínas. Se ha observado que la mayoría están implicadas en varios procesos celulares, incluyendo el tráfico intracelular, la formación de estructuras de soporte (especialmente para la formación de los canales iónicos de las sinapsis), la comunicación célula-célula o el crecimiento celular. Afortunadamente, una búsqueda más

específica en PubMed permitió identificar funciones que podrían estar implicadas en la inmunopatología inducida en la infección por estos virus. De hecho, algunas de estas proteínas regulan la activación del sistema inmune. Los casos más destacables son los de las proteínas PTPN13, Sintenina APBA3, DLG1, SCRIB, PICK1, LNX1 y LNX2. De estas proteínas, SCRIB, PICK, LNX1 y LNX2 tienen un efecto inhibidor de la inflamación. Una posibilidad es que los PBMs de SARS-CoV y MERS-CoV interaccionarían con los dominios PDZ de estas proteínas impidiéndoles reducir la inflamación.

SCRIB es una proteína que controla la activación equilibrada de linfocitos T. (Ludford-Menting y col., 2005). Asimismo, los macrófagos y células dendríticas sin SCRIB presentan una mayor predisposición a promover respuestas proinflamatorias (Zheng y col., 2016). MERS-CoV infecta células del sistema inmune (Yilla y col., 2005; Zhou y col., 2014) por lo que los PBMs de las proteínas E y 5, que interaccionan con SCRIB tienen el potencial de secuestrarla mediante la interacción con sus dominios PDZ, dando lugar al aumento de la respuesta proinflamatoria.

También se ha descrito que el PDZ de la proteína PICK1 interacciona con el PBM del receptor de TGF- $\beta$  1 (T $\beta$ RI) causando su endocitosis y posterior degradación, bloqueando la señalización mediada por TGF- $\beta$  (Zhao y col., 2012). TGF- $\beta$  es un importante promotor de apoptosis y participa en la atenuación de la respuesta inmune (Bierie y Moses, 2010). Probablemente por ello, se ha observado un aumento de la activación de p38 MAPK en células PICK1<sup>-/-</sup>. Asimismo, la sobre-expresión de PICK1 en macrófagos inhibe la respuesta proinflamatoria a partir de la inhibición de NF- $\kappa$ B, y favorece la respuesta anti-inflamatoria mediante la expresión de STAT6 (Xie y col., 2016).

Las proteínas LNX1 y 2 son E3 ubiquitina-ligasas que interaccionan mediante su PDZ con el PBM de CD8 en células T, dando lugar a su degradación (D'Agostino y col., 2011). Dado que CD8 es un correceptor del receptor de células T (TCR), necesario para su activación, LNX1 y 2 actúan como reguladores de la activación de los linfocitos T. Si los PBMs de la proteína E de SARS-CoV y las proteínas E y 5 de MERS-CoV secuestrasen LNX1 y 2 mediante su interacción con sus dominios PDZ, se provocaría una mayor activación de linfocitos T, lo que podría derivar en una mayor inmunopatología.

Por otro lado, APBA3 y DLG1 pueden mediar un aumento de la respuesta inflamatoria (Lasserre y col., 2010; Uematsu y col., 2016). La interacción de sus dominios PDZ con los PBMs de SARS y MERS-CoV podría dar lugar a su activación, con la consiguiente repercusión en la evolución de la patología derivada de la infección por estos virus.

APBA3 se une a HIF-1 en macrófagos provocando la activación de vías de señalización que estimulan NF- $\kappa$ B, lo que lleva a un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias. Una consecuencia de la activación de estas vías de señalización es que al



infectar ratones APBA3<sup>-/-</sup> con el virus de la gripe, otro virus respiratorio que induce patología pulmonar, estos ratones muestran un mejor pronóstico que los silvestres (Uematsu y col., 2016).

Las proteínas DLG1 y ezrina interaccionan en linfocitos T, al parecer en un proceso no mediado por PBM-PDZ (Lasserre y col., 2010). Si esta interacción no tiene lugar, no se produce una correcta activación de linfocitos T debido a que se produce una perturbación en los microtúbulos implicados en la sinapsis inmune y la vía de señalización de TCR no tiene lugar de forma óptima (Lasserre y col., 2010). Esta vía de señalización incluye la activación de p38 MAPK, entre otros inductores de inflamación (Crocetti y col., 2014). Sin embargo, la proteína DLG1 también está implicada en la regulación de la activación de los linfocitos T. En estas células se ensamblan los canales iónicos Kv1.3 cuyo funcionamiento es necesario para una activación de su respuesta inmune. Kv1.3 interacciona con DLG1, pero si esta interacción no tiene lugar, PKAI no puede inhibir Kv1.3, regulando la activación de los linfocitos T (Kuras y col., 2012). Por esta razón, la interacción de DLG1 con los PBM de las proteínas E de SARS-CoV y MERS-CoV podría alterar la actividad de los linfocitos T impidiendo la interacción entre DLG1 y Kv1.3 y favoreciendo la activación de p38 MAPK, induciendo una respuesta proinflamatoria.

También se han identificado varias proteínas con dominios PDZ que están implicadas en la activación del crecimiento celular, la mitosis o la inhibición de la apoptosis. Por esta razón, se ha descrito la relación de estas proteínas con diversos tipos de cáncer o con virus oncogénicos como HPV, HTLV-1, o los adenovirus (Kong y col., 2014; S. S. Lee y col., 2000; Subbaiah y col., 2011). Curiosamente, las rutas celulares utilizadas por estas proteínas para inducir la transformación oncogénica tienen factores comunes con las rutas que inducen inflamación. De esta observación se puede deducir que proteínas como DLG1, SCRIB o LNX1, descritas en el párrafo anterior, u otras como PTPN13 y Sintenina, sean reguladoras de la respuesta inmune y también estén implicadas en la transformación oncogénica. De hecho, los casos más representativos son los de las proteínas PTPN13 y Sintenina. Esta última, está sobre-expresada en melanomas y se ha implicado en metástasis mediante la activación de p38 MAPK y NF-κB (Boukerche y col., 2007). Su acción la podría realizar interaccionando mediante su dominio PDZ con el PBM de la proteína E de SARS-CoV. En nuestro laboratorio hemos descrito que esta interacción es responsable de la activación de p38 MAPK y NF-κB, induciendo una respuesta inflamatoria que lleva a una inflamación pulmonar exacerbada que termina con edema pulmonar y la muerte del huésped (Jimenez-Guardeño y col., 2014). PTPN13, también conocida como FAP-1, podría ser un buen candidato de estudio porque interacciona con proteínas de SARS-CoV y MERS-CoV y tiene un perfil similar a la Sintenina. En este caso, PTPN13 es una tirosina-fosfatasa que está sobre-expresada en algunos tipos de

cáncer, inhibiendo la apoptosis mediada por FAS. El mecanismo por el que PTPN13 ejerce esta función incluye la interacción con el PBM de FAP-1 mediada por el PDZ4 de PTPN13 y con I $\kappa$ B $\alpha$ , el inhibidor de NF- $\kappa$ B, provocando la defosforilación de su residuo Tyr-42. Esto provocaría un cambio conformacional en I $\kappa$ B $\alpha$  aumentando la susceptibilidad de la Ser-32 y Ser-36 a ser fosforiladas, con la consecuente degradación de este inhibidor y activación de NF- $\kappa$ B (Nakai y col., 2000). De forma análoga a la activación de la Sintenina mediante la unión al PBM de la proteína E de SARS-CoV mediada por el dominio PDZ, es probable que las proteínas E de SARS-CoV y las E y 5 de MERS-CoV interaccionen con PTPN13 activando NF- $\kappa$ B. Esto constituiría un nuevo mecanismo de acción de estos virus que explicaría su alta patogenicidad que puede llevar incluso a la muerte.

La información obtenida de los experimentos de doble híbrido de levadura realizados en esta tesis ha mostrado que una sola proteína viral puede interaccionar con varias proteínas celulares, induciendo una respuesta inflamatoria en un proceso aditivo o sinérgico debido a la activación de distintas rutas celulares. Por ello, el PBM de la proteína E del SARS-CoV es un factor con un alto potencial para causar patogenicidad. Ello muy probablemente se debe a su interacción con la Sintenina, y con proteínas como PTPN13 o PICK1 que contribuirían de forma aditiva o sinérgica a la respuesta proinflamatoria. Esta misma hipótesis se puede aplicar a la proteína E del MERS-CoV, cuyo PBM también es un factor de virulencia (Javier Gutiérrez-Álvarez y Luis Enjuanes, datos no publicados) y que, como se ha descrito en esta tesis, también interacciona con Sintenina, PTPN13 o PICK1. El gran número de proteínas con dominios PDZ con las que interaccionan estas proteínas virales da una idea de la alta complejidad de la relación virus-célula. El siguiente paso deberá ser el estudio en detalle de estas interacciones priorizando las que sean potencialmente más relevantes en virulencia como por ejemplo la interacción de las proteínas E de SARS-CoV y MERS-CoV con PTPN13 o la de la E de SARS-CoV y la 5 de MERS-CoV con PICK1.

En resumen, se podría concluir que además de los mecanismos que implican a los motivos estructurales de las proteínas de SARS-CoV y MERS-CoV E, 3a y 5 mostrados en esta tesis, se ha identificado la probable implicación de una alta variedad de vías alternativas de señalización mediadas por las proteínas virales estudiadas, que ayudarán a aclarar la complejidad de los mecanismos relacionados con la patología letal inducida por la infección de estos CoVs humanos. Por ello, proponemos continuar estos estudios analizando el efecto de las interacciones de los PBM virales con las proteínas celulares descritas en esta tesis y determinar las consecuencias en replicación y patogénesis de estas interacciones. Este conocimiento podrá ser utilizado para identificar péptidos o agentes químicos de bajo peso molecular que bloqueen estas interacciones y puedan ser utilizados como antivirales.

## **CONCLUSIONES**

1. El SARS-CoV incluye tres proteínas E, 3a y 8a, con actividad canal iónico con distinto nivel de impacto en la replicación del virus. De ellas, la proteína E es el factor de virulencia que tiene el mayor impacto en la replicación y patogenicidad del virus, seguida por la proteína 3a y, con menor relevancia, por la proteína 8a.
2. La proteína 3a forma canales iónicos no dependientes de voltaje con baja selectividad por cationes en presencia de  $K^+$  y  $Na^+$  y con selectividad poco significativa en presencia de  $Ca^{2+}$ .
3. Los aminoácidos Y91 y H93 localizados en el dominio transmembrana 2, y el Y109, situado en el dominio transmembrana 3 de la proteína 3a del SARS-CoV, son críticos para la actividad canal iónico de la proteína 3a.
4. La actividad canal iónico y el PBM de la proteína 3a del SARS-CoV no son factores de virulencia relevantes en contraste con los motivos homólogos presentes en la proteína E.
5. Al menos una de las proteínas E o 3a del SARS-CoV debe de estar presente en el virus para que este sea viable. Existe una complementación funcional entre los PBMs de las proteínas E y 3a de forma que un virus con al menos una de estas dos proteínas con su PBM funcional puede compensar la delección de la otra.
6. Se ha mostrado que las proteínas celulares MYCBP2, NCOA6, PIK3C2G y KLF10 interaccionan con el dominio carboxilo terminal de la proteína 3a. Estas proteínas están implicadas en el control de la inflamación, una de las causas de la virulencia del SARS-CoV. Por ello se propone que puedan modular la virulencia de este virus.
7. Se ha observado la presencia de proteínas con PBM en prácticamente todos los genomas de CoVs descritos hasta la fecha siendo más abundantes en los géneros *Alfacoronavirus* y *Betacoronavirus*.
8. Se han identificado proteínas celulares con dominios PDZ que interaccionan los PBMs de las proteínas E y 3a del SARS-CoV y E y 5 de MERS-CoV. Varias de estas proteínas como PTPN13, PICK1, DLG1 o LNX1 están implicadas en la regulación de la respuesta inmune y posiblemente están implicadas en la inducción de la patología por SARS-CoV y MERS-CoV.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Afroz, S., Giddaluru, J., Abbas, M.M., Khan, N., 2016.** Transcriptome meta-analysis reveals a dysregulation in extra cellular matrix and cell junction associated gene signatures during Dengue virus infection. *Sci. Rep.* 6, 33752.
- Aguilella, V.M., Queralt-Martin, M., Aguilella-Arzo, M., Alcaraz, A., 2011.** Insights on the permeability of wide protein channels: measurement and interpretation of ion selectivity. *Integr. Biol. (Camb).* 3, 159-172.
- Aldabe, R., Irurzun, A., Carrasco, L., 1997.** Poliovirus protein 2BC increases cytosolic free calcium concentrations. *J. Virol.* 71, 6214-6217.
- Almazan, F., DeDiego, M.L., Sola, I., Zuñiga, S., Nieto-Torres, J.L., Marquez-Jurado, S., Andres, G., Enjuanes, L., 2013.** Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. *MBio* 4, e00650-00613.
- Almazan, F., Galan, C., Enjuanes, L., 2004.** The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J. Virol.* 78, 12683-12688.
- Alsaad, K.O., Hajeer, A.H., Al Balwi, M., Al Moaiqel, M., Al Oudah, N., Al Ajlan, A., AlJohani, S., Alsolamy, S., Gmati, G.E., Balkhy, H., Al-Jahdali, H.H., Baharoon, S.A., Arabi, Y.M., 2018.** Histopathology of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infection - clinicopathological and ultrastructural study. *Histopathology* 72, 516-524.
- Annan, A., Baldwin, H.J., Corman, V.M., Klose, S.M., Owusu, M., Nkrumah, E.E., Badu, E.K., Anti, P., Agbenyega, O., Meyer, B., Oppong, S., Sarkodie, Y.A., Kalko, E.K., Lina, P.H., Godlevska, E.V., Reusken, C., Seebens, A., Gloza-Rausch, F., Vallo, P., Tschapka, M., Drosten, C., Drexler, J.F., 2013.** Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 456-459.
- Ao, D., Guo, H.C., Sun, S.Q., Sun, D.H., Fung, T.S., Wei, Y.Q., Han, S.C., Yao, X.P., Cao, S.Z., Liu, D.X., Liu, X.T., 2015.** Viroporin activity of the foot-and-mouth disease virus non-structural 2B protein. *PLoS One* 10, e0125828.
- Armbruster, V., Sauter, M., Roemer, K., Best, B., Hahn, S., Nty, A., Schmid, A., Philipp, S., Mueller, A., Mueller-Lantzsch, N., 2004.** Np9 protein of human endogenous retrovirus K interacts with ligand of numb protein X. *J. Virol.* 78, 10310-10319.
- Arpin-Andre, C., Mesnard, J.M., 2007.** The PDZ domain-binding motif of the human T cell leukemia virus type 1 tax protein induces mislocalization of the tumor suppressor hScrib in T cells. *J. Biol. Chem.* 282, 33132-33141.
- Assiri, A., McGeer, A., Perl, T.M., Price, C.S., Al Rabeeah, A.A., Cummings, D.A., Alabdullatif, Z.N., Assad, M., Almulhim, A., Makhdoom, H., Madani, H., Alhakeem, R., Al-Tawfiq, J.A., Cotten, M., Watson, S.J., Kellam, P., Zumla, A.I., Memish, Z.A., 2013.** Hospital outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *N. Engl. J. Med.*, doi:10.1056/NEJMoa1306742.
- Belotti, E., Polanowska, J., Daulat, A.M., Audebert, S., Thome, V., Lissitzky, J.C., Lembo, F., Blibek, K., Omi, S., Lenfant, N., Gangar, A., Montcouquiol, M., Santoni, M.J., Sebbagh, M., Aurrand-Lions, M., Angers, S., Kodjabachian, L., Reboul, J., Borg, J.P., 2013a.** The human PDZome: a gateway to PSD95-Disc large-zonula occludens (PDZ)-mediated functions. *Mol. Cell Proteomics* 12, 2587-2603.
- Belotti, E., Polanowska, J., Daulat, A.M., Audebert, S., Thome, V., Lissitzky, J.C., Lembo, F., Blibek, K., Omi, S., Lenfant, N., Gangar, A., Montcouquiol, M., Santoni, M.J., Sebbagh, M., Aurrand-Lions, M., Angers, S., Kodjabachian,**

- L., Reboul, J., Borg, J.P., 2013b.** The human PDZome: a gateway to PSD95-Disc large-zonula occludens (PDZ)-mediated functions. *Mol Cell Proteomics* 12, 2587-2603.
- Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D., 2000.** The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 11-21.
- Bezrukov, S.M., Vodyanoy, I., 1993.** Probing alamethicin channels with water-soluble polymers. Effect on conductance of channel states. *Biophys. J.* 64, 16-25.
- Bhattacharya, S., Dai, Z., Li, J., Baxter, S., Callaway, D.J., Cowburn, D., Bu, Z., 2010.** A conformational switch in the scaffolding protein NHERF1 controls autoinhibition and complex formation. *J. Biol. Chem.* 285, 9981-9994.
- Bierie, B., Moses, H.L., 2010.** Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 49-59.
- Bladt, F., Tafuri, A., Gelkop, S., Langille, L., Pawson, T., 2002.** Epidermolysis bullosa and embryonic lethality in mice lacking the multi-PDZ domain protein GRIP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 6816-6821.
- Blot, V., Delamarre, L., Perugi, F., Pham, D., Benichou, S., Benarous, R., Hanada, T., Chishti, A.H., Dokhalar, M.C., Pique, C., 2004.** Human Dlg protein binds to the envelope glycoproteins of human T-cell leukemia virus type 1 and regulates envelope mediated cell-cell fusion in T lymphocytes. *J. Cell Sci.* 117, 3983-3993.
- Boeda, B., El-Amraoui, A., Bahloul, A., Goodyear, R., Daviet, L., Blanchard, S., Perfettini, I., Fath, K.R., Shorte, S., Reiners, J., Houdusse, A., Legrain, P., Wolfrum, U., Richardson, G., Petit, C., 2002.** Myosin VIIa, harmonin and cadherin 23, three Usher I gene products that cooperate to shape the sensory hair cell bundle. *EMBO J.* 21, 6689-6699.
- Bolte, S., Cordelieres, F.P., 2006.** A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213-232.
- Boukerche, H., Su, Z.Z., Emdad, L., Sarkar, D., Fisher, P.B., 2007.** mda-9/Syntenin regulates the metastatic phenotype in human melanoma cells by activating nuclear factor-kappaB. *Cancer Res.* 67, 1812-1822.
- Cahalan, M.D., Wulff, H., Chandy, K.G., 2001.** Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J Clin Immunol* 21, 235-252.
- Caillet-Saguy, C., Maisonneuve, P., Delhommel, F., Terrien, E., Babault, N., Lafon, M., Cordier, F., Wolff, N., 2015.** Strategies to interfere with PDZ-mediated interactions in neurons: What we can learn from the rabies virus. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 119, 53-59.
- Cao, Z., Wara, A.K., Icli, B., Sun, X., Packard, R.R., Esen, F., Stapleton, C.J., Subramaniam, M., Kretschmer, K., Apostolou, I., von Boehmer, H., Hansson, G.K., Spelsberg, T.C., Libby, P., Feinberg, M.W., 2009.** Kruppel-like factor KLF10 targets transforming growth factor-beta1 to regulate CD4(+)CD25(-) T cells and T regulatory cells. *J. Biol. Chem.* 284, 24914-24924.
- Carlson, C.M., Endrizzi, B.T., Wu, J., Ding, X., Weinreich, M.A., Walsh, E.R., Wani, M.A., Lingrel, J.B., Hogquist, K.A., Jameson, S.C., 2006.** Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature* 442, 299-302.
- Carstens, E.B., 2010.** Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Arch. Virol.* 155, 133-146.

- Carvalho, L., Lopez, L., Fajardo, J.E., Jaureguiberry-Bravo, M., Fiser, A., Berman, J.W., 2017.** HIV-Tat regulates macrophage gene expression in the context of neuroAIDS. *PLoS One* 12, e0179882.
- Cavanagh, D., 2005.** Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol.* 34, 439-448.
- Chan, C.M., Tsoi, H., Chan, W.M., Zhai, S., Wong, C.O., Yao, X., Chan, W.Y., Tsui, S.K., Chan, H.Y., 2009.** The ion channel activity of the SARS-coronavirus 3a protein is linked to its pro-apoptotic function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 2232-2239.
- Chen, C.C., Kruger, J., Sramala, I., Hsu, H.J., Henklein, P., Chen, Y.M., Fischer, W.B., 2011.** ORF8a of SARS-CoV forms an ion channel: experiments and molecular dynamics simulations. *Biochim. Biophys. Acta.* 1808, 572-579.
- Chen, C.Y., Ping, Y.H., Lee, H.C., Chen, K.H., Lee, Y.M., Chan, Y.J., Lien, T.C., Jap, T.S., Lin, C.H., Kao, L.S., Chen, Y.M., 2007.** Open reading frame 8a of the human severe acute respiratory syndrome coronavirus not only promotes viral replication but also induces apoptosis. *J. Infect. Dis.* 196, 405-415.
- Chen, H.Y., Lin, M.H., Chen, C.C., Shu, J.C., 2017.** The expression of fibronectin is significantly suppressed in macrophages to exert a protective effect against *Staphylococcus aureus* infection. *BMC Microbiol.* 17, 92.
- Chen, J., Subbarao, K., 2007.** The Immunobiology of SARS\*. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 443-472.
- Chen, Q., Niu, X., Xu, Y., Wu, J., Shi, Y., 2007.** Solution structure and backbone dynamics of the AF-6 PDZ domain/Bcr peptide complex. *Protein Sci.* 16, 1053-1062.
- Chinese-Consortium, S.M.E., 2004.** Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China. *Science* 303, 1666-1669.
- Chiu, R.W., Chim, S.S., Tong, Y.K., Fung, K.S., Chan, P.K., Zhao, G.P., Lo, Y.M., 2005.** Tracing SARS-coronavirus variant with large genomic deletion. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 168-170.
- Chu, D.K., Peiris, J.S., Chen, H., Guan, Y., Poon, L.L., 2008.** Genomic characterizations of bat coronaviruses (1A, 1B and HKU8) and evidence for co-infections in *Miniopterus* bats. *J. Gen. Virol.* 89, 1282-1287.
- Chung, S.H., Frese, K.K., Weiss, R.S., Prasad, B.V., Javier, R.T., 2007.** A new crucial protein interaction element that targets the adenovirus E4-ORF1 oncoprotein to membrane vesicles. *J. Virol.* 81, 4787-4797.
- Clapham, D.E., 2007.** Calcium signaling. *Cell* 131, 1047-1058.
- Crawford, S.E., Hyser, J.M., Utama, B., Estes, M.K., 2012.** Autophagy hijacked through viroporin-activated calcium/calmodulin-dependent kinase-beta signaling is required for rotavirus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, E3405-E3413.
- Crocetti, J., Silva, O., Humphries, L.A., Tibbs, M.D., Miceli, M.C., 2014.** Selective phosphorylation of the Dlg1AB variant is critical for TCR-induced p38 activation and induction of proinflammatory cytokines in CD8+ T cells. *J. Immunol.* 193, 2651-2660.
- D'Agostino, D.M., Silic-Benussi, M., Hiraragi, H., Lairmore, M.D., Ciminale, V., 2005.** The human T-cell leukemia virus type 1 p13II protein: effects on mitochondrial function and cell growth. *Cell Death Differ.* 12 Suppl 1, 905-915.



- D'Agostino, M., Tornillo, G., Caporaso, M.G., Barone, M.V., Ghigo, E., Bonatti, S., Mottola, G., 2011.** Ligand of Numb proteins LNX1p80 and LNX2 interact with the human glycoprotein CD8alpha and promote its ubiquitylation and endocytosis. *J. Cell Sci.* 124, 3545-3556.
- Day, C.W., Baric, R., Cai, S.X., Frieman, M., Kumaki, Y., Morrey, J.D., Smees, D.F., Barnard, D.L., 2009.** A new mouse-adapted strain of SARS-CoV as a lethal model for evaluating antiviral agents in vitro and in vivo. *Virology* 395, 210-222.
- de Groot, R.J., Baker, S.C., Baric, R., Enjuanes, L., Gorbalenya, A.E., Holmes, K.V., Perlman, S., Poon, L., Rottier, P.J.M., Talbot, P.J., Woo, P.C.Y., Ziebuhr, J., 2012.** Family Coronaviridae, in: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy*. Elsevier, Amsterdam, pp. 774-796.
- de Haan, C.A.M., Smeets, M., Vernooij, F., Vennema, H., Pottier, P.J.M., 1999.** Mapping of the coronavirus membrane protein domains involved in interaction with the spike protein. *J. Virol.* 73, 7441-7452.
- de Jong, A.S., Visch, H.J., de Mattia, F., van Dommelen, M.M., Swarts, H.G., Luyten, T., Callewaert, G., Melchers, W.J., Willems, P.H., van Kuppeveld, F.J., 2006.** The coxsackievirus 2B protein increases efflux of ions from the endoplasmic reticulum and Golgi, thereby inhibiting protein trafficking through the Golgi. *J. Biol. Chem.* 281, 14144-14150.
- DeDiego, M.L., Alvarez, E., Almazan, F., Rejas, M.T., Lamirande, E., Roberts, A., Shieh, W.J., Zaki, S.R., Subbarao, K., Enjuanes, L., 2007.** A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J. Virol.* 81, 1701-1713.
- DeDiego, M.L., Nieto-Torres, J.L., Jimenez-Guardeño, J.M., Regla-Nava, J.A., Alvarez, E., Oliveros, J.C., Zhao, J., Fett, C., Perlman, S., Enjuanes, L., 2011.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein regulates cell stress response and apoptosis. *PLoS Pathog.* 7, e1002315.
- DeDiego, M.L., Nieto-Torres, J.L., Regla-Nava, J.A., Jimenez-Guardeño, J.M., Fernandez-Delgado, R., Fett, C., Castaño-Rodriguez, C., Perlman, S., Enjuanes, L., 2014.** Inhibition of NF-kappaB mediated inflammation in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected mice increases survival. *J. Virol.* 88, 913-924.
- DeDiego, M.L., Pewe, L., Alvarez, E., Rejas, M.T., Perlman, S., Enjuanes, L., 2008.** Pathogenicity of severe acute respiratory coronavirus deletion mutants in hACE-2 transgenic mice. *Virology* 376, 379-389.
- Ding, Q., Heller, B., Capuccino, J.M., Song, B., Nimgaonkar, I., Hrebikova, G., Contreras, J.E., Ploss, A., 2017.** Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, 1147-1152.
- Donnelly, C.A., Ghani, A.C., Leung, G.M., Hedley, A.J., Fraser, C., Riley, S., Abu-Raddad, L.J., Ho, L.-M., Thach, T.-Q., Chau, P., 2003.** Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *Lancet* 361, 1761-1766.
- Drexler, J.F., Gloza-Rausch, F., Glende, J., Corman, V.M., Muth, D., Goettsche, M., Seebens, A., Niedrig, M., Pfefferle, S., Yordanov, S., Zhelyazkov, L., Hermanns, U., Vallo, P., Lukashev, A., Muller, M.A., Deng, H., Herrler, G., Drosten, C., 2010.** Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of

- coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J. Virol.* 84, 11336-11349.
- Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A., Berger, A., Burguiere, A.M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.C., Muller, S., Rickerts, V., Sturmer, M., Vieth, S., Klenk, H.D., Osterhaus, A.D., Schmitz, H., Doerr, H.W., 2003.** Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348, 1967-1976.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S., Vestweber, D., 2004.** Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J. Cell Sci.* 117, 19-29.
- Ellencrona, K., Syed, A., Johansson, M., 2009.** Flavivirus NS5 associates with host-cell proteins zonula occludens-1 (ZO-1) and regulating synaptic membrane exocytosis-2 (RIMS2) via an internal PDZ binding mechanism. *Biol. Chem.* 390, 319-323.
- Enjuanes, L., Almazan, F., Sola, I., Zuñiga, S., 2006a.** Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 211-230.
- Enjuanes, L., Almazan, F., Sola, I., Zuñiga, S., Alvarez, E., Reguera, J., Capiscol, C., 2006b.** Biochemical aspects of coronavirus replication. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581, 13-24.
- Enjuanes, L., DeDiego, M.L., Alvarez, E., Capiscol, C., Baric, R., 2008a.** Vaccines for severe acute respiratory syndrome virus and other coronaviruses, in: Perlman, S., Gallagher, T.M., Snijder, E.J. (Eds.), *Nidoviruses*. ASM Press, Washington, pp. 379-408.
- Enjuanes, L., Gorbalenya, A.E., de Groot, R.J., Cowley, J.A., Ziebuhr, J., Snijder, E.J., 2008b.** The Nidovirales, in: Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M., Walker, P., Majumder-Russell, D. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, Third Edition. Elsevier Ltd., Oxford, pp. 419-430.
- Ewart, G.D., Sutherland, T., Gage, P.W., Cox, G.B., 1996.** The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. *J. Virol.* 70, 7108-7115.
- Falcon, A., Vazquez-Moron, S., Casas, I., Aznar, C., Ruiz, G., Pozo, F., Perez-Brena, P., Juste, J., Ibanez, C., Garin, I., Aihartza, J., Echevarria, J.E., 2011.** Detection of alpha and betacoronaviruses in multiple Iberian bat species. *Arch. Virol.* 156, 1883-1890.
- Fett, C., DeDiego, M.L., Regla-Nava, J.A., Enjuanes, L., Perlman, S., 2013.** Complete protection against severe acute respiratory syndrome coronavirus-mediated lethal respiratory disease in aged mice by immunization with a mouse-adapted virus lacking E protein. *J. Virol.* 87, 6551-6559.
- Florek, D., Ehmann, R., Kristen-Burmann, C., Lemmermeyer, T., Lochnit, G., Ziebuhr, J., Thiel, H.J., Tekes, G., 2017.** Identification and characterization of a Golgi retention signal in feline coronavirus accessory protein 7b. *J. Gen. Virol.* 98, 2017-2029.
- Formstecher, E., Aresta, S., Collura, V., Hamburger, A., Meil, A., Trehin, A., Reverdy, C., Betin, V., Maire, S., Brun, C., Jacq, B., Arpin, M., Bellaiche, Y., Bellusci, S., Benaroch, P., Bornens, M., Chanet, R., Chavrier, P., Delattre, O., Doye, V., Fehon, R., Faye, G., Galli, T., Girault, J.A., Goud, B., de**

- Gunzburg, J., Johannes, L., Junier, M.P., Mirouse, V., Mukherjee, A., Papadopoulos, D., Perez, F., Plessis, A., Rosse, C., Saule, S., Stoppa-Lyonnet, D., Vincent, A., White, M., Legrain, P., Wojcik, J., Camonis, J., Daviet, L., 2005. Protein interaction mapping: a *Drosophila* case study. *Genome Res.* 15, 376-384.
- Franks, T.J., Chong, P.Y., Chui, P., Galvin, J.R., Lourens, R.M., Reid, A.H., Selbs, E., McEvoy, C.P., Hayden, C.D., Fukuoka, J., Taubenberger, J.K., Travis, W.D., 2003. Lung pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a study of 8 autopsy cases from Singapore. *Hum. Pathol.* 34, 743-748.
- Freundt, E.C., Yu, L., Goldsmith, C.S., Welsh, S., Cheng, A., Yount, B., Liu, W., Frieman, M.B., Buchholz, U.J., Screaton, G.R., Lippincott-Schwartz, J., Zaki, S.R., Xu, X.N., Baric, R.S., Subbarao, K., Lenardo, M.J., 2010. The open reading frame 3a protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus promotes membrane rearrangement and cell death. *J. Virol.* 84, 1097-1109.
- Frieman, M., Heise, M., Baric, R., 2008. SARS coronavirus and innate immunity. *Virus Res.* 133, 101-112.
- Fromont-Racine, M., Rain, J.C., Legrain, P., 1997. Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat. Genet.* 16, 277-282.
- Fukutomi, T., Tsunemitsu, H., Akashi, H., 1999. Detection of bovine coronaviruses from adult cows with epizootic diarrhea and their antigenic and biological diversities. *Arch. Virol.* 144, 997-1006.
- Gallagher, T.M., Buchmeier, M.J., 2001. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology* 279, 371-374.
- Gallardo, R., Ivarsson, Y., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Zimmermann, P., 2010. Structural diversity of PDZ-lipid interactions. *Chembiochem* 11, 456-467.
- Gan, S.W., Tan, E., Lin, X., Yu, D., Wang, J., Tan, G.M., Vararattanavech, A., Yeo, C.Y., Soon, C.H., Soong, T.W., Pervushin, K., Torres, J., 2012. The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. *J. Biol. Chem.* 287, 24671-24689.
- Ganti, K., Broniarczyk, J., Manoubi, W., Massimi, P., Mittal, S., Pim, D., Szalmas, A., Thatte, J., Thomas, M., Tomaic, V., Banks, L., 2015. The human papillomavirus E6 PDZ binding motif: from life cycle to malignancy. *Viruses* 7, 3530-3551.
- Garbino, J., Crespo, S., Aubert, J.D., Rochat, T., Ninet, B., Deffernez, C., Wunderli, W., Pache, J.C., Socal, P.M., Kaiser, L., 2006. A prospective hospital-based study of the clinical impact of non-severe acute respiratory syndrome (Non-SARS)-related human coronavirus infection. *Clin. Infect. Dis.* 43, 1009-1015.
- Gerek, Z.N., Keskin, O., Ozkan, S.B., 2009. Identification of specificity and promiscuity of PDZ domain interactions through their dynamic behavior. *Proteins* 77, 796-811.
- Giorda, K.M., Raghava, S., Zhang, M.W., Hebert, D.N., 2013. The viroporin activity of the minor structural proteins VP2 and VP3 is required for SV40 propagation. *J. Biol. Chem.* 288, 2510-2520.
- Gladue, D.P., Holinka, L.G., Largo, E., Fernandez Sainz, I., Carrillo, C., O'Donnell, V., Baker-Branstetter, R., Lu, Z., Ambroggio, X., Risatti, G.R., Nieva, J.L., Borca, M.V., 2012. Classical swine fever virus p7 protein is a viroporin involved in virulence in swine. *J. Virol.* 86, 6778-6791.

- Golebiewski, L., Liu, H., Javier, R.T., Rice, A.P., 2011.** The avian influenza virus NS1 ESEV PDZ binding motif associates with Dlg1 and Scribble to disrupt cellular tight junctions. *J. Virol.* 85, 10639-10648.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P., Blinov, V.M., 1989.** Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 17, 4847-4861.
- Govorkova, E.A., Webster, R.G., 2010.** Combination chemotherapy for influenza. *Viruses* 2, 1510-1529.
- Graham, R.L., Donaldson, E.F., Baric, R.S., 2013.** A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 836-848.
- Grassel, L., Fast, L.A., Scheffer, K.D., Boukhallouk, F., Spoden, G.A., Tenzer, S., Boller, K., Bago, R., Rajesh, S., Overduin, M., Berditchevski, F., Florin, L., 2016.** The CD63-Syntenin-1 complex controls post-endocytic trafficking of oncogenic human papillomaviruses. *Sci. Rep.* 6, 32337.
- Griffin, S.D., 2009.** Plugging the holes in hepatitis C virus antiviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 12567-12568.
- Griffin, S.D., Beales, L.P., Clarke, D.S., Worsfold, O., Evans, S.D., Jaeger, J., Harris, M.P., Rowlands, D.J., 2003.** The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* 535, 34-38.
- Hamazaki, Y., Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Tsukita, S., 2002.** Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* 277, 455-461.
- Han, Z., Harty, R.N., 2004.** The NS3 protein of bluetongue virus exhibits viroporin-like properties. *J. Biol. Chem.* 279, 43092-43097.
- Handa, Y., Durkin, C.H., Dodding, M.P., Way, M., 2013.** Vaccinia virus F11 promotes viral spread by acting as a PDZ-containing scaffolding protein to bind myosin-9A and inhibit RhoA signaling. *Cell Host Microbe* 14, 51-62.
- Harris, B.Z., Lim, W.A., 2001.** Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J. Cell Sci.* 114, 3219-3231.
- He, J., Melnik, L.I., Komin, A., Wiedman, G., Fuselier, T., Morris, C.F., Starr, C.G., Searson, P.C., Gallaher, W.R., Hristova, K., Garry, R.F., Wimley, W.C., 2017.** Ebola virus delta peptide is a viroporin. *J. Virol.*, DOI:10.1128/JVI.00438-00417.
- Henkel, M., Mitzner, D., Henklein, P., Meyer-Almes, F.J., Moroni, A., Difrancesco, M.L., Henkes, L.M., Kreim, M., Kast, S.M., Schubert, U., Thiel, G., 2010.** The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 forms a nonselective ion channel. *PLoS One* 5, e11112.
- Hildebrand, J.D., Soriano, P., 1999.** Shroom, a PDZ domain-containing actin-binding protein, is required for neural tube morphogenesis in mice. *Cell* 99, 485-497.
- Hille, B., 2001.** *Ion Channels of Excitable Membranes*, Third Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hillier, B.J., Christopherson, K.S., Prehoda, K.E., Brettt, D.S., Lim, W.A., 1999.** Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science* 284, 812-815.

- Hodgkin, A.L., Katz, B., 1949.** The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J. Physiol.* 108, 37-77.
- Holland, S., Coste, O., Zhang, D.D., Pierre, S.C., Geisslinger, G., Scholich, K., 2011.** The ubiquitin ligase MYCBP2 regulates transient receptor potential vanilloid receptor 1 (TRPV1) internalization through inhibition of p38 MAPK signaling. *J. Biol. Chem.* 286, 3671-3680.
- Hollenhorst, M.I., Richter, K., Fronius, M., 2011.** Ion transport by pulmonary epithelia. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 174306.
- Hongo, S., Ishii, K., Mori, K., Takashita, E., Muraki, Y., Matsuzaki, Y., Sugawara, K., 2004.** Detection of ion channel activity in *Xenopus laevis* oocytes expressing Influenza C virus CM2 protein. *Arch. Virol.* 149, 35-50.
- Hover, S., Foster, B., Barr, J.N., Mankouri, J., 2017.** Viral dependence on cellular ion channels - an emerging anti-viral target? *J. Gen. Virol.* 98, 345-351.
- Hsiao, C.H., Chang, M.F., Hsueh, P.R., Su, I.J., 2005.** Immunohistochemical study of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus in tissue sections of patients. *J. Formos. Med. Assoc.* 104, 150-156.
- Hsu, E.C., Lin, Y.C., Hung, C.S., Huang, C.J., Lee, M.Y., Yang, S.C., Ting, L.P., 2007.** Suppression of hepatitis B viral gene expression by protein-tyrosine phosphatase PTPN3. *J. Biomed. Sci.* 14, 731-744.
- Hsu, H.J., Fischer, W.B., 2012.** In silico investigations of possible routes of assembly of ORF 3a from SARS-CoV. *J. Mol. Model.* 18, 501-514.
- Hu, B., Li, S., Zhang, Z., Xie, S., Hu, Y., Huang, X., Zheng, Y., 2016.** HCV NS4B targets Scribble for proteasome-mediated degradation to facilitate cell transformation. *Tumour Biol.* 37, 12387-12396.
- Hu, B., Zeng, L.P., Yang, X.L., Ge, X.Y., Zhang, W., Li, B., Xie, J.Z., Shen, X.R., Zhang, Y.Z., Wang, N., Luo, D.S., Zheng, X.S., Wang, M.N., Daszak, P., Wang, L.F., Cui, J., Shi, Z.L., 2017.** Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathog.* 13, e1006698.
- Huang, C., Ito, N., Tseng, C.T., Makino, S., 2006.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a accessory protein is a viral structural protein. *J. Virol.* 80, 7287-7294.
- Huang, Y.W., Dickerman, A.W., Pineyro, P., Li, L., Fang, L., Kiehne, R., Opriessnig, T., Meng, X.J., 2013.** Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *MBio* 4, e00737-00713.
- Hung, A.Y., Sheng, M., 2002.** PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J. Biol. Chem.* 277, 5699-5702.
- Hyser, J.M., Collinson-Pautz, M.R., Utama, B., Estes, M.K., 2010.** Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. *MBio* 1, e00265-00210.
- Ichinohe, T., Pang, I.K., Iwasaki, A., 2010.** Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat. Immunol.* 11, 404-410.
- Ito, M., Yanagi, Y., Ichinohe, T., 2012.** Encephalomyocarditis virus viroporin 2B activates NLRP3 inflammasome. *PLoS Pathog.* 8, e1002857.
- Jackson, D., Hossain, M.J., Hickman, D., Perez, D.R., Lamb, R.A., 2008.** A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 4381-4386.

- Jacobs, L., Van der Zeijst, B.A.M., Horzinek, M., 1986.** Characterization and translation of transmissible gastroenteritis virus mRNAs. *J. Virol.* 57, 1010-1015.
- James, C.D., Roberts, S., 2016.** Viral Interactions with PDZ domain-containing proteins-an oncogenic trait? *Pathogens* 5.
- Javier, R.T., Rice, A.P., 2011.** Emerging theme: cellular PDZ proteins as common targets of pathogenic viruses. *J. Virol.* 85, 11544-11556.
- Jimenez, G., Correa, I., Melgosa, M.P., Bullido, M.J., Enjuanes, L., 1986.** Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *J. Virol.* 60, 131-139.
- Jimenez-Guardeno, J.M., Regla-Nava, J.A., Nieto-Torres, J.L., DeDiego, M.L., Castano-Rodriguez, C., Fernandez-Delgado, R., Perlman, S., Enjuanes, L., 2015.** Identification of the mechanisms causing reversion to virulence in an attenuated SARS-CoV for the design of a genetically stable vaccine. *PLoS Pathog.* 11, e1005215.
- Jimenez-Guardeno, J.M., Nieto-Torres, J.L., DeDiego, M.L., Regla-Nava, J.A., Fernandez-Delgado, R., Castaño-Rodriguez, C., Enjuanes, L., 2014.** The PDZ-binding motif of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein Is a determinant of viral pathogenesis. *PLoS Pathog.* 10, e1004320.
- Joubert, D.A., Blasdel, K.R., Audsley, M.D., Trinidad, L., Monaghan, P., Dave, K.A., Lieu, K.G., Amos-Ritchie, R., Jans, D.A., Moseley, G.W., Gorman, J.J., Walker, P.J., 2014.** Bovine ephemeral fever rhabdovirus alpha1 protein has viroporin-like properties and binds importin beta1 and importin 7. *J. Virol.* 88, 1591-1603.
- Kan, B., Wang, M., Jing, H., Xu, H., Jiang, X., Yan, M., Liang, W., Zheng, H., Wan, K., Liu, Q., Cui, B., Xu, Y., Zhang, E., Wang, H., Ye, J., Li, G., Li, M., Cui, Z., Qi, X., Chen, K., Du, L., Gao, K., Zhao, Y.T., Zou, X.Z., Feng, Y.J., Gao, Y.F., Hai, R., Yu, D., Guan, Y., Xu, J., 2005.** Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms. *J. Virol.* 79, 11892-11900.
- Kanzawa, N., Nishigaki, K., Hayashi, T., Ishii, Y., Furukawa, S., Niino, A., Yasui, F., Kohara, M., Morita, K., Matsushima, K., Le, M.Q., Masuda, T., Kannagi, M., 2006.** Augmentation of chemokine production by severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a/X1 and 7a/X4 proteins through NF-kappaB activation. *FEBS Lett.* 580, 6807-6812.
- Kennedy, M.B., 1995.** Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. *Trends Biochem. Sci.* 20, 350.
- Kiyono, T., Hiraiwa, A., Fujita, M., Hayashi, Y., Akiyama, T., Ishibashi, M., 1997.** Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11612-11616.
- Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S.H., Zevenhoven-Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Koster, A.J., Mommaas, A.M., Snijder, E.J., 2008.** SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol.* 6, e226.
- Kong, K., Kumar, M., Taruishi, M., Javier, R.T., 2014.** The human adenovirus E4-ORF1 protein subverts discs large 1 to mediate membrane recruitment and dysregulation of phosphatidylinositol 3-kinase. *PLoS Pathog.* 10, e1004102.

- Krishna Subbaiah, V., Massimi, P., Boon, S.S., Myers, M.P., Sharek, L., Garcia-Mata, R., Banks, L., 2012.** The invasive capacity of HPV transformed cells requires the hDlg-dependent enhancement of SGEF/RhoG activity. *PLoS Pathog.* 8, e1002543.
- Kruger, J., Fischer, W.B., 2009.** Assembly of Viral Membrane Proteins. *J. Chem. Theory Comput.* 5, 2503-2513.
- Kuo, L., Hurst, K.R., Masters, P.S., 2006.** Exceptional flexibility in the sequence requirements for coronavirus small envelope protein (E) function. *J. Virol.* 81, 2249-2262.
- Kuras, Z., Kucher, V., Gordon, S.M., Neumeier, L., Chimote, A.A., Filipovich, A.H., Conforti, L., 2012.** Modulation of Kv1.3 channels by protein kinase A I in T lymphocytes is mediated by the disc large 1-tyrosine kinase Lck complex. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 302, C1504-1512.
- Lamirande, E.W., DeDiego, M.L., Roberts, A., Jackson, J.P., Alvarez, E., Sheahan, T., Shieh, W.J., Zaki, S.R., Baric, R., Enjuanes, L., Subbarao, K., 2008.** A live attenuated SARS coronavirus is immunogenic and efficacious in golden Syrian hamsters. *J. Virol.* 82, 7721-7724.
- Lasserre, R., Charrin, S., Cuhe, C., Danckaert, A., Thoulouze, M.I., de Chaumont, F., Duong, T., Perrault, N., Varin-Blank, N., Olivo-Marin, J.C., Etienne-Manneville, S., Arpin, M., Di Bartolo, V., Alcover, A., 2010.** Ezrin tunes T-cell activation by controlling Dlg1 and microtubule positioning at the immunological synapse. *EMBO J.* 29, 2301-2314.
- Latorre, I.J., Roh, M.H., Frese, K.K., Weiss, R.S., Margolis, B., Javier, R.T., 2005.** Viral oncoprotein-induced mislocalization of select PDZ proteins disrupts tight junctions and causes polarity defects in epithelial cells. *J. Cell Sci.* 118, 4283-4293.
- Lau, S.K., Woo, P.C., Li, K.S., Huang, Y., Tsoi, H.W., Wong, B.H., Wong, S.S., Leung, S.Y., Chan, K.H., Yuen, K.Y., 2005.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 14040-14045.
- Lau, S.K., Woo, P.C., Li, K.S., Tsang, A.K., Fan, R.Y., Luk, H.K., Cai, J.P., Chan, K.H., Zheng, B.J., Wang, M., Yuen, K.Y., 2015.** Discovery of a novel coronavirus, China Rattus coronavirus HKU24, from Norway rats supports the murine origin of Betacoronavirus 1 and has implications for the ancestor of Betacoronavirus lineage A. *J. Virol.* 89, 3076-3092.
- Lauber, C., Ziebuhr, J., Junglen, S., Drosten, C., Zirkel, F., Nga, P.T., Morita, K., Snijder, E.J., Gorbalenya, A.E., 2012.** Mesoniviridae: a proposed new family in the order Nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses. *Arch. Virol.* 157, 1623-1628.
- Lee, C., Hodgins, D., Calvert, J.G., Welch, S.K., Jolie, R., Yoo, D., 2006.** Mutations within the nuclear localization signal of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein attenuate virus replication. *Virology* 346, 238-250.
- Lee, H.J., Zheng, J.J., 2010.** PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Commun. Signal.* 8, 8.
- Lee, H.R., Cho, Y.Y., Lee, G.Y., You, D.G., Yoo, Y.D., Kim, Y.J., 2017.** A direct role for hepatitis B virus X protein in inducing mitochondrial membrane permeabilization. *J. Viral Hepat.*, DOI: 10.1111/jvh.12831.

- Lee, S.K., Na, S.Y., Jung, S.Y., Choi, J.E., Jhun, B.H., Cheong, J., Meltzer, P.S., Lee, Y.C., Lee, J.W., 2000.** Activating protein-1, nuclear factor-kappaB, and serum response factor as novel target molecules of the cancer-amplified transcription coactivator ASC-2. *Mol. Endocrinol.* 14, 915-925.
- Lee, S.S., Glaunsinger, B., Mantovani, F., Banks, L., Javier, R.T., 2000.** Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J. Virol.* 74, 9680-9693.
- Lenfant, N., Polanowska, J., Bamps, S., Omi, S., Borg, J.P., Reboul, J., 2010.** A genome-wide study of PDZ-domain interactions in *C. elegans* reveals a high frequency of non-canonical binding. *BMC Genomics* 11, 671.
- Leon-Juarez, M., Martinez-Castillo, M., Shrivastava, G., Garcia-Cordero, J., Villegas-Sepulveda, N., Mondragon-Castelan, M., Mondragon-Flores, R., Cedillo-Barron, L., 2016.** Recombinant Dengue virus protein NS2B alters membrane permeability in different membrane models. *Virol. J.* 13, 1.
- Li, W., Moore, M.J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S.K., Berne, M.A., Somasundaran, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K., Greenough, T.C., Choe, H., Farzan, M., 2003.** Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for de SARS coronavirus. *Nature* 426, 450-454.
- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J.H., Wang, H., Crameri, G., Hu, Z., Zhang, H., Zhang, J., McEachern, J., Field, H., Daszak, P., Eaton, B.T., Zhang, S., Wang, L.F., 2005.** Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 310, 676-679.
- Liao, Y., Lescar, J., Tam, J.P., Liu, D.X., 2004.** Expression of SARS-coronavirus envelope protein in *Escherichia coli* cells alters membrane permeability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 374-380.
- Lim, K.P., Liu, D.X., 2001.** The missing link in coronavirus assembly. Retention of the avian coronavirus infectious bronchitis virus envelope protein in the pre-Golgi compartments and physical interaction between the envelope and membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 17515-17523.
- Lipsitch, M., Cohen, T., Cooper, B., Robins, J.M., Ma, S., James, L., Gopalakrishna, G., Chew, S.K., Tan, C.C., Samore, M.H., Fisman, D., Murray, M., 2003.** Transmission dynamics and control of severe acute respiratory syndrome. *Science* 300, 1966-1970.
- Liu, H., Golebiewski, L., Dow, E.C., Krug, R.M., Javier, R.T., Rice, A.P., 2010.** The ESEV PDZ-binding motif of the avian influenza A virus NS1 protein protects infected cells from apoptosis by directly targeting Scribble. *J. Virol.* 84, 11164-11174.
- Long, J.F., Tochio, H., Wang, P., Fan, J.S., Sala, C., Niethammer, M., Sheng, M., Zhang, M., 2003.** Supramodular structure and synergistic target binding of the N-terminal tandem PDZ domains of PSD-95. *J. Mol. Biol.* 327, 203-214.
- Lu, W., Zheng, B.J., Xu, K., Schwarz, W., Du, L., Wong, C.K., Chen, J., Duan, S., Deubel, V., Sun, B., 2006.** Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 12540-12545.
- Lu, X., Pan, J., Tao, J., Guo, D., 2011.** SARS-CoV nucleocapsid protein antagonizes IFN-beta response by targeting initial step of IFN-beta induction pathway, and its C-terminal region is critical for the antagonism. *Virus Genes* 42, 37-45.



- Luck, K., Charbonnier, S., Trave, G., 2012.** The emerging contribution of sequence context to the specificity of protein interactions mediated by PDZ domains. *FEBS Lett.* 586, 2648-2661.
- Ludford-Menting, M.J., Oliaro, J., Sacirbegovic, F., Cheah, E.T., Pedersen, N., Thomas, S.J., Pasam, A., Iazzolino, R., Dow, L.E., Waterhouse, N.J., Murphy, A., Ellis, S., Smyth, M.J., Kershaw, M.H., Darcy, P.K., Humbert, P.O., Russell, S.M., 2005.** A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation. *Immunity* 22, 737-748.
- Lunney, J.K., Benfield, D.A., Rowland, R.R., 2010.** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: an update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Virus Res.* 154, 1-6.
- Lupieri, A., Smirnova, N., Malet, N., Gayral, S., Laffargue, M., 2015.** PI3K signaling in arterial diseases: Non redundant functions of the PI3K isoforms. *Adv. Biol. Regul.* 59, 4-18.
- Madan, V., Garcia Mde, J., Sanz, M.A., Carrasco, L., 2005.** Viroporin activity of murine hepatitis virus E protein. *FEBS Lett.* 579, 3607-3612.
- Makokha, G.N., Takahashi, M., Higuchi, M., Saito, S., Tanaka, Y., Fujii, M., 2013.** Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein interacts with and mislocalizes the PDZ domain protein MAGI-1. *Cancer Sci.* 104, 313-320.
- Marziali, F., Bugnon Valdano, M., Brunet Avalos, C., Moriena, L., Cavatorta, A.L., Gardiol, D., 2017.** Interference of HTLV-1 Tax protein with cell polarity regulators: Defining the subcellular localization of the Tax-DLG1 interaction. *Viruses* 9, 355.
- Masante, C., El Najjar, F., Chang, A., Jones, A., Moncman, C.L., Dutch, R.E., 2014.** The human metapneumovirus small hydrophobic protein has properties consistent with those of a viroporin and can modulate viral fusogenic activity. *J. Virol.* 88, 6423-6433.
- Masters, P.S., 2006.** The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 66, 193-292.
- Matalon, S., Bartoszewski, R., Collawn, J.F., 2015.** Role of epithelial sodium channels in the regulation of lung fluid homeostasis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 309, L1229-1238.
- Mateos-Gomez, P.A., Morales, L., Zuñiga, S., Enjuanes, L., Sola, I., 2013.** Long-distance RNA-RNA interactions in the coronavirus genome form high-order structures promoting discontinuous RNA synthesis during transcription. *J. Virol.* 87, 177-186.
- Mateos-Gomez, P.A., Zuñiga, S., Palacio, L., Enjuanes, L., Sola, I., 2011.** Gene N proximal and distal RNA motifs regulate coronavirus nucleocapsid mRNA transcription. *J. Virol.* 85, 8968-8980.
- Matthay, M.A., Zemans, R.L., 2011.** The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu. Rev. Pathol.* 6, 147-163.
- McAuley, J.L., Tate, M.D., MacKenzie-Kludas, C.J., Pinar, A., Zeng, W., Stutz, A., Latz, E., Brown, L.E., Mansell, A., 2013.** Activation of the NLRP3 inflammasome by IAV virulence protein PB1-F2 contributes to severe pathophysiology and disease. *PLoS Pathog.* 9, e1003392.
- McIntosh, K., Kapikian, A.Z., Hardison, K.A., Hartley, J.W., Chanock, R.M., 1969.** Antigenic relationships among the coronaviruses of man and between human and animal coronaviruses. *J. Immunol.* 102, 1109-1118.

- Melik, W., Ellencrona, K., Wigerius, M., Hedstrom, C., Elvang, A., Johansson, M., 2012.** Two PDZ binding motifs within NS5 have roles in Tick-borne encephalitis virus replication. *Virus Res.* 169, 54-62.
- Melton, J.V., Ewart, G.D., Weir, R.C., Board, P.G., Lee, E., Gage, P.W., 2002.** Alphavirus 6K proteins form ion channels. *J. Biol. Chem.* 277, 46923-46931.
- Menachery, V.D., Yount, B.L., Jr., Debbink, K., Agnihothram, S., Gralinski, L.E., Plante, J.A., Graham, R.L., Scobey, T., Ge, X.Y., Donaldson, E.F., Randell, S.H., Lanzavecchia, A., Marasco, W.A., Shi, Z.L., Baric, R.S., 2015.** A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat. Med.* 21, 1508-1513.
- Miura, T.A., Holmes, K.V., 2009.** Host-pathogen interactions during coronavirus infection of primary alveolar epithelial cells. *J. Leukoc. Biol.* 86, 1145-1151.
- Mould, J.A., Paterson, R.G., Takeda, M., Ohgashi, Y., Venkataraman, P., Lamb, R.A., Pinto, L.H., 2003.** Influenza B virus BM2 protein has ion channel activity that conducts protons across membranes. *Dev. Cell* 5, 175-184.
- Muller, M.A., Paweska, J.T., Leman, P.A., Drosten, C., Grywna, K., Kemp, A., Braack, L., Sonnenberg, K., Niedrig, M., Swanepoel, R., 2007.** Coronavirus antibodies in African bat species. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1367-1370.
- Muller, M.A., van der Hoek, L., Voss, D., Bader, O., Lehmann, D., Schulz, A.R., Kallies, S., Suliman, T., Fielding, B.C., Drosten, C., Niedrig, M., 2010.** Human coronavirus NL63 open reading frame 3 encodes a virion-incorporated N-glycosylated membrane protein. *Virol. J.* 7, 6.
- Munz, M., Hein, J., Biggin, P.C., 2012.** The role of flexibility and conformational selection in the binding promiscuity of PDZ domains. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002749.
- Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Fukushi, S., Harashima, A., Sato, Y., Saijo, M., Taguchi, F., Morikawa, S., Sata, T., 2008.** Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. *Am. J. Pathol.* 172, 1625-1637.
- Nakai, Y., Irie, S., Sato, T.A., 2000.** Identification of I $\kappa$ B $\alpha$  as a substrate of Fas-associated phosphatase-1. *Eur. J. Biochem.* 267, 7170-7175.
- Narayanan, K., Huang, C., Makino, S., 2008.** SARS coronavirus accessory proteins. *Virus Res.* 133, 113-121.
- Narayanan, K., Maeda, J., Maeda, A., Makino, S., 2000.** Mechanism of specific coronavirus RNA packaging into virus particles, 19th Annual Meeting. American Society for Virology, Colorado, p. 84.
- Netland, J., DeDiego, M.L., Zhao, J., Fett, C., Alvarez, E., Nieto-Torres, J.L., Enjuanes, L., Perlman, S., 2010.** Immunization with an attenuated severe acute respiratory syndrome coronavirus deleted in E protein protects against lethal respiratory disease. *Virology* 399, 120-128.
- Ng, D.L., Al Hosani, F., Keating, M.K., Gerber, S.I., Jones, T.L., Metcalfe, M.G., Tong, S., Tao, Y., Alami, N.N., Haynes, L.M., Mutei, M.A., Abdel-Wareth, L., Uyeki, T.M., Swerdlow, D.L., Barakat, M., Zaki, S.R., 2016.** Clinicopathologic, immunohistochemical, and ultrastructural findings of a fatal case of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus infection in the United Arab Emirates, April 2014. *Am. J. Pathol.* 186, 652-658.
- Nguyen, V.P., Hogue, B.G., 1997.** Protein interactions during coronavirus assembly. *J. Virol.* 71, 9278-9284.

- Nicholls, J.M., Butany, J., Poon, L.L., Chan, K.H., Beh, S.L., Poutanen, S., Peiris, J.S., Wong, M., 2006. Time course and cellular localization of SARS-CoV nucleoprotein and RNA in lungs from fatal cases of SARS. *PLoS Med.* 3, e27.
- Nicholls, J.M., Poon, L.L., Lee, K.C., Ng, W.F., Lai, S.T., Leung, C.Y., Chu, C.M., Hui, P.K., Mak, K.L., Lim, W., Yan, K.W., Chan, K.H., Tsang, N.C., Guan, Y., Yuen, K.Y., Peiris, J.S., 2003. Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361, 1773-1778.
- Nieto-Torres, J.L., Dediego, M.L., Alvarez, E., Jimenez-Guardeno, J.M., Regla-Nava, J.A., Llorente, M., Kremer, L., Shuo, S., Enjuanes, L., 2011. Subcellular location and topology of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. *Virology* 415, 69-82.
- Nieto-Torres, J.L., DeDiego, M.L., Verdia-Baguena, C., Jimenez-Guardeño, J.M., Regla-Nava, J.A., Alcaraz, A., Aguilella, V.M., Enjuanes, L., 2013. Relevance of SARS-CoV E protein ion channel activity in virus fitness and virulence, 32nd Annual Meeting. The American Society for Virology, The Pennsylvania State's University, State College, Pennsylvania, USA.
- Nieto-Torres, J.L., Dediego, M.L., Verdia-Baguena, C., Jimenez-Guardeño, J.M., Regla-Nava, J.A., Fernandez-Delgado, R., Castaño-Rodriguez, C., Alcaraz, A., Torres, J., Aguilella, V.M., Enjuanes, L., 2014. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS Pathog.* 10, e1004077.
- Nieto-Torres, J.L., Verdia-Baguena, C., Castano-Rodriguez, C., Aguilella, V.M., Enjuanes, L., 2015a. Relevance of viroporin ion channel activity on viral replication and pathogenesis. *Viruses* 7, 3552-3573.
- Nieto-Torres, J.L., Verdia-Baguena, C., Jimenez-Guardeno, J.M., Regla-Nava, J.A., Castano-Rodriguez, C., Fernandez-Delgado, R., Torres, J., Aguilella, V.M., Enjuanes, L., 2015b. Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. *Virology* 485, 330-339.
- Nieva, J.L., Madan, V., Carrasco, L., 2012. Viroporins: structure and biological functions. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 563-574.
- Nourry, C., Grant, S.G., Borg, J.P., 2003. PDZ domain proteins: plug and play! *Sci. STKE* 2003, RE7.
- Obenauer, J.C., Denson, J., Mehta, P.K., Su, X., Mukatira, S., Finkelstein, D.B., Xu, X., Wang, J., Ma, J., Fan, Y., Rakestraw, K.M., Webster, R.G., Hoffmann, E., Krauss, S., Zheng, J., Zhang, Z., Naeve, C.W., 2006. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science* 311, 1576-1580.
- Obitsu, S., Ahmed, N., Nishitsuji, H., Hasegawa, A., Nakahama, K., Morita, I., Nishigaki, K., Hayashi, T., Masuda, T., Kannagi, M., 2009. Potential enhancement of osteoclastogenesis by severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a/X1 protein. *Arch. Virol.* 154, 1457-1464.
- Ohashi, M., Sakurai, M., Higuchi, M., Mori, N., Fukushi, M., Oie, M., Coffey, R.J., Yoshiura, K., Tanaka, Y., Uchiyama, M., Hatanaka, M., Fujii, M., 2004. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein induces and interacts with a multi-PDZ domain protein, MAGI-3. *Virology* 320, 52-62.
- Oostra, M., de Haan, C.A., Rottier, P.J., 2007. The 29-nucleotide deletion present in human but not in animal severe acute respiratory syndrome coronaviruses disrupts the functional expression of open reading frame 8. *J. Virol.* 81, 13876-13888.

- Page, K.W., Britton, P., Bournsnel, M.E.G., 1990.** Sequence analysis of the leader RNA of two porcine coronaviruses: transmissible gastroenteritis coronavirus and porcine respiratory coronavirus. *Virus Genes* 4, 289-301.
- Panjwani, A., Strauss, M., Gold, S., Wenham, H., Jackson, T., Chou, J.J., Rowlands, D.J., Stonehouse, N.J., Hogle, J.M., Tuthill, T.J., 2014.** Capsid protein VP4 of human rhinovirus induces membrane permeability by the formation of a size-selective multimeric pore. *PLoS Pathog.* 10, e1004294.
- Papadakis, K.A., Krempski, J., Reiter, J., Svingen, P., Xiong, Y., Sarmento, O.F., Huseby, A., Johnson, A.J., Lomberg, G.A., Urrutia, R.A., Faubion, W.A., 2015.** Kruppel-like factor KLF10 regulates transforming growth factor receptor II expression and TGF-beta signaling in CD8+ T lymphocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 308, C362-3671.
- Pavlovic, D., Neville, D.C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R.A., Fischer, W.B., Zitzmann, N., 2003.** The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 6104-6108.
- Peiris, J.S., Chu, C.M., Cheng, V.C., Chan, K.S., Hung, I.F., Poon, L.L., Law, K.I., Tang, B.S., Hon, T.Y., Chan, C.S., Chan, K.H., Ng, J.S., Zheng, B.J., Ng, W.L., Lai, R.W., Guan, Y., Yuen, K.Y., 2003.** Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 361, 1767-1772.
- Perlman, S., Netland, J., 2009.** Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 439-450.
- Pfefferle, S., Krahling, V., Ditt, V., Grywna, K., Muhlberger, E., Drosten, C., 2009.** Reverse genetic characterization of the natural genomic deletion in SARS-Coronavirus strain Frankfurt-1 open reading frame 7b reveals an attenuating function of the 7b protein in-vitro and in-vivo. *Virol. J.* 6, 131.
- Pinto, L.H., Holsinger, L.J., Lamb, R.A., 1992.** Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 69, 517-528.
- Plotnik, D., Guo, W., Cleveland, B., von Haller, P., Eng, J.K., Guttman, M., Lee, K.K., Arthos, J., Hu, S.L., 2017.** Extracellular matrix proteins mediate HIV-1 gp120 interactions with  $\alpha 4\beta 7$ . *J. Virol.* 91, e01005-01017.
- Plugge, B., Gazzarrini, S., Nelson, M., Cerana, R., Van Etten, J.L., Derst, C., DiFrancesco, D., Moroni, A., Thiel, G., 2000.** A potassium channel protein encoded by chlorella virus PBCV-1. *Science* 287, 1641-1644.
- Poirson, J., Biquand, E., Straub, M.L., Cassonnet, P., Nomine, Y., Jones, L., van der Werf, S., Trave, G., Zanier, K., Jacob, Y., Demeret, C., Masson, M., 2017.** Mapping the interactome of HPV E6 and E7 oncoproteins with the ubiquitin-proteasome system. *FEBS J.* 284, 3171-3201.
- Ponting, C.P., 1997.** Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Sci.* 6, 464-468.
- Prehaud, C., Wolff, N., Terrien, E., Lafage, M., Megret, F., Babault, N., Cordier, F., Tan, G.S., Maitrepierre, E., Menager, P., Choppy, D., Hoos, S., England, P., Delepierre, M., Schnell, M.J., Buc, H., Lafon, M., 2010.** Attenuation of rabies virulence: takeover by the cytoplasmic domain of its envelope protein. *Sci. Signal.* 3, ra5.
- Pyrce, K., Berkhout, B., van der Hoek, L., 2007.** The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. *J. Virol.* 81, 3051-3057.

- Quan, P.L., Firth, C., Street, C., Henriquez, J.A., Petrosov, A., Tashmukhamedova, A., Hutchison, S.K., Egholm, M., Osinubi, M.O., Niezgoda, M., Ogunkoya, A.B., Briese, T., Rupprecht, C.E., Lipkin, W.I., 2010. Identification of a severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in a leaf-nosed bat in Nigeria. *MBio* 1, e00208-00210.
- Razanskas, R., Sasnauskas, K., 2010. Interaction of hepatitis B virus core protein with human GIPC1. *Arch. Virol.* 155, 247-250.
- Rebmann, G.M., Grabski, R., Sanchez, V., Britt, W.J., 2016. Phosphorylation of the Golgi peripheral membrane protein Grasp65 is an integral step in formation of the human cytomegalovirus cytoplasmic assembly compartment. *MBio* 7, e01554-01516.
- Regla-Nava, J.A., Nieto-Torres, J.L., Jimenez-Guardeno, J.M., Fernandez-Delgado, R., Fett, C., Castano-Rodriguez, C., Perlman, S., Enjuanes, L., DeDiego, M.L., 2015. Severe acute respiratory syndrome coronaviruses with mutations in the E protein are attenuated and promising vaccine candidates. *J. Virol.* 89, 3870-3887.
- Remaut, H., Waksman, G., 2006. Protein-protein interaction through beta-strand addition. *Trends Biochem. Sci.* 31, 436-444.
- Rider, M.A., Cheerathodi, M.R., Hurwitz, S.N., Nkosi, D., Howell, L.A., Tremblay, D.C., Liu, X., Zhu, F., Meckes, D.G., Jr., 2018. The interactome of EBV LMP1 evaluated by proximity-based BioID approach. *Virology* 516, 55-70.
- Riley, S., Fraser, C., Donnelly, C.A., Ghani, A.C., Abu-Raddad, L.J., Hedley, A.J., Leung, G.M., Ho, L.-M., Lam, T.-H., Thach, T.Q., Chau, P., Chan, K.-P., Lo, S.-V., Leung, P.-Y., Tsang, T., Ho, W., Lee, K.-H., Lau, E.M.C., Ferguson, N.M., Anderson, R.M., 2003. Transmission Dynamics of the Etiological Agent of SARS in Hong Kong: Impact of Public Health Interventions. *Science* 300, 1961-1966.
- Rivera, L.E., Kraiselburd, E., Melendez, L.M., 2016. Cystatin B and HIV regulate the STAT-1 signaling circuit in HIV-infected and INF-beta-treated human macrophages. *J. Neurovirol.* 22, 666-673.
- Roberts, A., Deming, D., Paddock, C.D., Cheng, A., Yount, B., Vogel, L., Herman, B.D., Sheahan, T., Heise, M., Genrich, G.L., Zaki, S.R., Baric, R., Subbarao, K., 2007. A mouse-adapted SARS-coronavirus causes disease and mortality in BALB/c mice. *PLoS Pathog.* 3, 23-37.
- Roberts, A., Vogel, L., Guarner, J., Hayes, N., Murphy, B., Zaki, S., Subbarao, K., 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of golden Syrian hamsters. *J. Virol.* 79, 503-511.
- Rock, K.L., Goldberg, A.L., 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 739-779.
- Rota, P.A., Oberste, M.S., Monroe, S.S., Nix, W.A., Campganoli, R., Icenogle, J.P., Peñaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M.-H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J.L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D.d., Peret, T.C.T., Burns, C., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rassmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus, A.D.M.E., Drosten, C., Pallansch, M.A., Anderson, L.J., Bellini, W.J., 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 300, 1394-1399.

- Rousset, R., Fabre, S., Desbois, C., Bantignies, F., Jalinot, P., 1998.** The C-terminus of the HTLV-1 Tax oncoprotein mediates interaction with the PDZ domain of cellular proteins. *Oncogene* 16, 643-654.
- Ruch, T.R., Machamer, C.E., 2012.** The Coronavirus E Protein: Assembly and Beyond. *Viruses* 4, 363-382.
- Saif, L.J., Wesley, R.D., 1992.** Transmissible gastroenteritis, in: Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*, 7th ed. Wolfe Publishing Ltd, Ames. Iowa, pp. 362-386.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001.** *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., 1990.** Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis. *J. Virol.* 64, 1050-1056.
- Schaecher, S.R., Mackenzie, J.M., Pekosz, A., 2007.** The ORF7b protein of SARS-CoV is expressed in virus-infected cells and incorporated into SARS-CoV particles. *J. Virol.* 81, 718-731.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012.** NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671-675.
- Schubert, U., Ferrer-Montiel, A.V., Oblatt-Montal, M., Henklein, P., Strebel, K., Montal, M., 1996.** Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells. *FEBS Lett.* 398, 12-18.
- Sette, P., O'Connor, S.K., Yerramilli, V.S., Dussupt, V., Nagashima, K., Chutiraka, K., Lingappa, J., Scarlata, S., Bouamr, F., 2016.** HIV-1 Nucleocapsid mimics the membrane adaptor Syntenin to gain access to ESCRTs and promote virus budding. *Cell Host Microbe* 19, 336-348.
- Shen, S., Lin, P.S., Chao, Y.C., Zhang, A., Yang, X., Lim, S.G., Hong, W., Tan, Y.J., 2005.** The severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a is a novel structural protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 286-292.
- Shieh, W.J., Hsiao, C.H., Paddock, C.D., Guarner, J., Goldsmith, C.S., Tatti, K., Packard, M., Mueller, L., Wu, M.Z., Rollin, P., Su, I.J., Zaki, S.R., 2005.** Immunohistochemical, in situ hybridization, and ultrastructural localization of SARS-associated coronavirus in lung of a fatal case of severe acute respiratory syndrome in Taiwan. *Hum. Pathol.* 36, 303-309.
- Snijder, E.J., Spaan, W.J.M., 1995.** The coronaviruslike superfamily, in: Siddell, S.G. (Ed.), *The Coronaviridae*. Plenum press, New York, pp. 239-252.
- Sola, I., Almazán, F., Zúñiga, S., Enjuanes, L., 2015.** Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses. *Annu. Rev. Virol.* 2, 265-288.
- Sola, I., Mateos-Gomez, P.A., Almazan, F., Zúñiga, S., Enjuanes, L., 2011.** RNA-RNA and RNA-protein interactions in coronavirus replication and transcription. *RNA Biol.* 8, 237-248.
- Sola, I., Moreno, J.L., Zúñiga, S., Alonso, S., Enjuanes, L., 2005.** Role of nucleotides immediately flanking the transcription-regulating sequence core in coronavirus subgenomic mRNA synthesis. *J. Virol.* 79, 2506-2516.
- Song, C., Wang, W., Li, M., Liu, Y., Zheng, D., 2009.** Tax1 enhances cancer cell proliferation via Ras-Raf-MEK-ERK signaling pathway. *IUBMB Life* 61, 685-692.
- Song, D., Park, B., 2012.** Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* 44, 167-175.

- Song, H.D., Tu, C.C., Zhang, G.W., Wang, S.Y., Zheng, K., Lei, L.C., Chen, Q.X., Gao, Y.W., Zhou, H.Q., Xiang, H., Zheng, H.J., Chern, S.W., Cheng, F., Pan, C.M., Xuan, H., Chen, S.J., Luo, H.M., Zhou, D.H., Liu, Y.F., He, J.F., Qin, P.Z., Li, L.H., Ren, Y.Q., Liang, W.J., Yu, Y.D., Anderson, L., Wang, M., Xu, R.H., Wu, X.W., Zheng, H.Y., Chen, J.D., Liang, G., Gao, Y., Liao, M., Fang, L., Jiang, L.Y., Li, H., Chen, F., Di, B., He, L.J., Lin, J.Y., Tong, S., Kong, X., Du, L., Hao, P., Tang, H., Bernini, A., Yu, X.J., Spiga, O., Guo, Z.M., Pan, H.Y., He, W.Z., Manuguerra, J.C., Fontanet, A., Danchin, A., Niccolai, N., Li, Y.X., Wu, C.I., Zhao, G.P., 2005.** Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 2430-2435.
- Spiegel, M., Pichlmair, A., Martinez-Sobrido, L., Cros, J., Garcia-Sastre, A., Haller, O., Weber, F., 2005.** Inhibition of beta interferon induction by severe acute respiratory syndrome coronavirus suggests a two-step model for activation of interferon regulatory factor 3. *J. Virol.* 79, 2079-2086.
- Stadler, K., Masignani, V., Eickmann, M., Becker, S., Abrignani, S., Klenk, H.D., Rappuoli, R., 2003.** SARS--beginning to understand a new virus. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 209-218.
- Stein, M.F., Blume, K., Heilingloh, C.S., Kummer, M., Biesinger, B., Sticht, H., Steinkasserer, A., 2015.** CD83 and GRASP55 interact in human dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 459, 42-48.
- Stodola, J.K., Dubois, G., Le Coupanec, A., Desforges, M., Talbot, P.J., 2018.** The OC43 human coronavirus envelope protein is critical for infectious virus production and propagation in neuronal cells and is a determinant of neurovirulence and CNS pathology. *Virology* 515, 134-149.
- Storrs, C.H., Silverstein, S.J., 2007.** PATJ, a tight junction-associated PDZ protein, is a novel degradation target of high-risk human papillomavirus E6 and the alternatively spliced isoform 18 E6. *J. Virol.* 81, 4080-4090.
- Subbaiah, V.K., Kranjec, C., Thomas, M., Banks, L., 2011.** PDZ domains: the building blocks regulating tumorigenesis. *Biochem. J.* 439, 195-205.
- Surya, W., Li, Y., Verdia-Baguena, C., Aguilera, V.M., Torres, J., 2015.** MERS coronavirus envelope protein has a single transmembrane domain that forms pentameric ion channels. *Virus Res.* 201, 61-66.
- Suzuki, T., Orba, Y., Okada, Y., Sunden, Y., Kimura, T., Tanaka, S., Nagashima, K., Hall, W.W., Sawa, H., 2010.** The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *PLoS Pathog.* 6, e1000801.
- Suzuki, T., Uchida-Toita, M., Yoshida, M., 1999.** Tax protein of HTLV-1 inhibits CBP/p300-mediated transcription by interfering with recruitment of CBP/p300 onto DNA element of E-box or p53 binding site. *Oncogene* 18, 4137-4143.
- Tan, Y.J., Teng, E., Shen, S., Tan, T.H.P., Goh, P.Y., Fielding, B.C., Ooi, E.E., Tan, H.C., Lim, S.G., Hong, W., 2004.** A novel severe acute respiratory syndrome coronavirus protein, U274, is transported to the cell surface and undergoes endocytosis. *J. Virol.* 78, 6723-6734.
- Tang, N.L., 2009.** Immunogenetic studies in SARS: developing a clinical prognostic profile for severe diseases. *Hong Kong Med. J.* 15 Suppl 8, 8-10.
- Teoh, K.T., Siu, Y.L., Chan, W.L., Schluter, M.A., Liu, C.J., Peiris, J.S., Bruzzone, R., Margolis, B., Nal, B., 2010.** The SARS coronavirus E protein interacts with

- PALS1 and alters tight junction formation and epithelial morphogenesis. *Mol. Biol. Cell.* 21, 3838-3852.
- Thiel, V., Ivanov, K.A., Putics, A., Hertzog, T., Schelle, B., Bayer, S., Wessbrich, B., Snijder, E.J., Rabenau, H., Doerr, H.W., Gorbalenya, A.E., Ziebuhr, J., 2003.** Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J. Gen. Virol.* 84, 2305-2315.
- Thomas, M., Massimi, P., Navarro, C., Borg, J.P., Banks, L., 2005.** The hScrib/Dlg apico-basal control complex is differentially targeted by HPV-16 and HPV-18 E6 proteins. *Oncogene* 24, 6222-6230.
- Tisoncik, J.R., Korth, M.J., Simmons, C.P., Farrar, J., Martin, T.R., Katze, M.G., 2012.** Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 16-32.
- Tomaic, V., Gardiol, D., Massimi, P., Ozbun, M., Myers, M., Banks, L., 2009.** Human and primate tumour viruses use PDZ binding as an evolutionarily conserved mechanism of targeting cell polarity regulators. *Oncogene* 28, 1-8.
- Tooze, J., Tooze, S.A., Fuller, S.D., 1987.** Sorting of progeny coronavirus from condensed secretory proteins at the exit from the trans-golgi network of atT20 cells. *J. Cell Biol.* 105, 1215-1226.
- Triantafilou, K., Kar, S., Vakakis, E., Kotecha, S., Triantafilou, M., 2013.** Human respiratory syncytial virus viroporin SH: a viral recognition pathway used by the host to signal inflammasome activation. *Thorax* 68, 66-75.
- Uematsu, T., Fujita, T., Nakaoka, H.J., Hara, T., Kobayashi, N., Murakami, Y., Seiki, M., Sakamoto, T., 2016.** Mint3/Apba3 depletion ameliorates severe murine influenza pneumonia and macrophage cytokine production in response to the influenza virus. *Sci. Rep.* 6, 37815.
- Vennema, H., Godeke, G.J., Rossen, J.W.A., Voorhout, W.F., Horzinek, M.C., Opstelten, D.J., Rottier, P.J.M., 1996.** Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J.* 15, 2020-2028.
- Verdia-Baguena, C., Nieto-Torres, J.L., Alcaraz, A., Dediego, M.L., Torres, J., Aguilella, V.M., Enjuanes, L., 2012.** Coronavirus E protein forms ion channels with functionally and structurally-involved membrane lipids. *Virology* 432, 485-494.
- Vergadi, E., Ieronymaki, E., Lyroni, K., Vaporidi, K., Tsatsanis, C., 2017.** Akt signaling pathway in macrophage activation and M1/M2 polarization. *J. Immunol.* 198, 1006-1014.
- Vincentelli, R., Luck, K., Poirson, J., Polanowska, J., Abdat, J., Blemont, M., Turchetto, J., Iv, F., Ricquier, K., Straub, M.L., Forster, A., Cassonnet, P., Borg, J.P., Jacob, Y., Masson, M., Nomine, Y., Reboul, J., Wolff, N., Charbonnier, S., Trave, G., 2015.** Quantifying domain-ligand affinities and specificities by high-throughput holdup assay. *Nat. Methods* 12, 787-793.
- Walker, P.J., Bonami, J.R., Boonsaeng, V., Chang, P.S., Cowley, J.A., Enjuanes, L., Flegel, T.W., Lightner, D.V., Loh, P.C., Snijder, E.J., Tang, K., 2005.** *Roniviridae*, in: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, California, pp. 975-979.
- Wang, K., Boysen, C., Shizuya, H., Simon, M.I., Hood, L., 1997.** Complete nucleotide sequence of two generations of a bacterial artificial chromosome cloning vector. *BioTechniques* 23, 992-994.



- Wang, K., Lu, W., Chen, J., Xie, S., Shi, H., Hsu, H., Yu, W., Xu, K., Bian, C., Fischer, W.B., Schwarz, W., Feng, L., Sun, B., 2012. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production. *FEBS Lett.* 586, 384-391.
- Werme, K., Wigerius, M., Johansson, M., 2008. Tick-borne encephalitis virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferon-stimulated JAK-STAT signalling. *Cell. Microbiol.* 10, 696-712.
- Wetherill, L.F., Holmes, K.K., Verow, M., Muller, M., Howell, G., Harris, M., Fishwick, C., Stonehouse, N., Foster, R., Blair, G.E., Griffin, S., Macdonald, A., 2012. High-risk human papillomavirus E5 oncoprotein displays channel-forming activity sensitive to small-molecule inhibitors. *J. Virol.* 86, 5341-5351.
- Wilson, K.C., Center, D.M., Cruikshank, W.W., Zhang, Y., 2003. Binding of HTLV-1 tax oncoprotein to the precursor of interleukin-16, a T cell PDZ domain-containing protein. *Virology* 306, 60-67.
- Wilson, L., Gage, P., Ewart, G., 2006. Hexamethylene amiloride blocks E protein ion channels and inhibits coronavirus replication. *Virology* 353, 294-306.
- Wilson, L., McKinlay, C., Gage, P., 2004. SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. *Virology* 330, 322-331.
- Wong, S.K., Li, W., Moore, M.J., Choe, H., Farzan, M., 2004. A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J. Biol. Chem.* 279, 3197-3201.
- Woo, P.C., Lau, S.K., Huang, Y., Yuen, K.Y., 2009. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp. Biol. Med.* 234, 1117-1127.
- Woo, P.C., Lau, S.K., Lam, C.S., Lau, C.C., Tsang, A.K., Lau, J.H., Bai, R., Teng, J.L., Tsang, C.C., Wang, M., Zheng, B.J., Chan, K.H., Yuen, K.Y., 2012. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J. Virol.* 86, 3995-4008.
- Xie, J., Wu, X., Zhou, Q., Yang, Y., Tian, Y., Huang, C., Meng, X., Li, J., 2016. PICK1 confers anti-inflammatory effects in acute liver injury via suppressing M1 macrophage polarization. *Biochimie* 127, 121-132.
- Ye, J., Zhang, B., Xu, J., Chang, Q., McNutt, M.A., Korteweg, C., Gong, E., Gu, J., 2007. Molecular Pathology in the Lungs of Severe Acute Respiratory Syndrome Patients. *Am. J. Pathol.* 170, 538-545.
- Ye, Y., Hauns, K., Langland, J.O., Jacobs, B.L., Hogue, B.G., 2007. Mouse hepatitis coronavirus A59 nucleocapsid protein is a type I interferon antagonist. *J. Virol.* 81, 2554-2563.
- Yilla, M., Harcourt, B.H., Hickman, C.J., McGrew, M., Tamin, A., Goldsmith, C.S., Bellini, W.J., Anderson, L.J., 2005. SARS-coronavirus replication in human peripheral monocytes/macrophages. *Virus. Res.* 107, 93-101.
- Yount, B., Roberts, R.S., Sims, A.C., Deming, D., Frieman, M.B., Sparks, J., Denison, M.R., Davis, N., Baric, R.S., 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus group-specific open reading frames encode nonessential functions for replication in cell cultures and mice. *J. Virol.* 79, 14909-14922.
- Yu, J., Li, X., Wang, Y., Li, B., Li, H., Li, Y., Zhou, W., Zhang, C., Wang, Y., Rao, Z., Bartlam, M., Cao, Y., 2011. PDLim2 selectively interacts with the PDZ

- binding motif of highly pathogenic avian H5N1 influenza A virus NS1. *PLoS One* 6, e19511.
- Yuan, X., Li, J., Shan, Y., Yang, Z., Zhao, Z., Chen, B., Yao, Z., Dong, B., Wang, S., Chen, J., Cong, Y., 2005.** Subcellular localization and membrane association of SARS-CoV 3a protein. *Virus Res.* 109, 191-202.
- Zeng, R., Yang, R.F., Shi, M.D., Jiang, M.R., Xie, Y.H., Ruan, H.Q., Jiang, X.S., Shi, L., Zhou, H., Zhang, L., Wu, X.D., Lin, Y., Ji, Y.Y., Xiong, L., Jin, Y., Dai, E.H., Wang, X.Y., Si, B.Y., Wang, J., Wang, H.X., Wang, C.E., Gan, Y.H., Li, Y.C., Cao, J.T., Zuo, J.P., Shan, S.F., Xie, E., Chen, S.H., Jiang, Z.Q., Zhang, X., Wang, Y., Pei, G., Sun, B., Wu, J.R., 2004.** Characterization of the 3a protein of SARS-associated coronavirus in infected vero E6 cells and SARS patients. *J. Mol. Biol.* 341, 271-279.
- Zhang, J., Yan, X., Shi, C., Yang, X., Guo, Y., Tian, C., Long, J., Shen, Y., 2008.** Structural basis of beta-catenin recognition by Tax-interacting protein-1. *J. Mol. Biol.* 384, 255-263.
- Zhang, K., Hou, Q., Zhong, Z., Li, X., Chen, H., Li, W., Wen, J., Wang, L., Liu, W., Zhong, F., 2013.** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus activates inflammasomes of porcine alveolar macrophages via its small envelope protein E. *Virology* 442, 156-162.
- Zhang, M., Zeng, C.Q., Morris, A.P., Estes, M.K., 2000.** A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *J. Virol.* 74, 11663-11670.
- Zhang, R., Wang, K., Lv, W., Yu, W., Xie, S., Xu, K., Schwarz, W., Xiong, S., Sun, B., 2014.** The ORF4a protein of human coronavirus 229E functions as a viroporin that regulates viral production. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1088-1095.
- Zhang, R., Wang, K., Ping, X., Yu, W., Qian, Z., Xiong, S., Sun, B., 2015.** The ns12.9 accessory protein of human coronavirus OC43 is a viroporin involved in virion morphogenesis and pathogenesis. *J. Virol.* 89, 11383-11395.
- Zhang, Y., 2014.** New swine deltacoronavirus (SDCV), p. <http://www.ohioagriculture.gov/addl/>.
- Zhang, Z., Yuan, Y., Fan, D., Yang, J., Mao, Z., Yan, Y., Chen, J., 2015.** Scylla serrata reovirus p35 protein expressed in Escherichia coli cells alters membrane permeability. *Virus Genes* 51, 69-76.
- Zhao, B., Wang, Q., Du, J., Luo, S., Xia, J., Chen, Y.G., 2012.** PICK1 promotes caveolin-dependent degradation of TGF-beta type I receptor. *Cell Res.* 22, 1467-1478.
- Zhao, Z., Zhang, F., Xu, M., Huang, K., Zhong, W., Cai, W., Yin, Z., Huang, S., Deng, Z., Wei, M., Xiong, J., Hawkey, P.M., 2003.** Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China. *J. Med. Microbiol.* 52, 715-720.
- Zheng, W., Umitsu, M., Jagan, I., Tran, C.W., Ishiyama, N., BeGora, M., Araki, K., Ohashi, P.S., Ikura, M., Muthuswamy, S.K., 2016.** An interaction between Scribble and the NADPH oxidase complex controls M1 macrophage polarization and function. *Nat. Cell Biol.* 18, 1244-1252.
- Zhou, J., Chu, H., Li, C., Wong, B.H., Cheng, Z.S., Poon, V.K., Sun, T., Lau, C.C., Wong, K.K., Chan, J.Y., Chan, J.F., To, K.K., Chan, K.H., Zheng, B.J., Yuen, K.Y., 2014.** Active replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus

- and aberrant induction of inflammatory cytokines and chemokines in human macrophages: implications for pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 209, 1331-1342.
- Ziebuhr, J., 2005.** The coronavirus replicase, in: Enjuanes, L. (Ed.), *Coronavirus replication and reverse genetics*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 57-94.
- Ziebuhr, J., Snijder, E.J., Gorbalenya, A.E., 2000.** Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the *Nidovirales*. *J. Gen. Virol.* 81, 853-879.
- Zuñiga, S., Cruz, J.L., Sola, I., Mateos-Gomez, P.A., Palacio, L., Enjuanes, L., 2010.** Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *J. Virol.* 84, 2169-2175.
- Zuñiga, S., Sola, I., Alonso, S., Enjuanes, L., 2004.** Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J. Virol.* 78, 980-994.
- Zuñiga, S., Sola, I., Moreno, J.L., Sabella, P., Plana-Duran, J., Enjuanes, L., 2007.** Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology* 357, 215-227.

## **ANEXO**

En este anexo se incluyen todas las publicaciones experimentales realizadas y la primera página de las revisiones.